



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

COMPLEJO REGIONAL CENTRO

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**APROVECHAMIENTO DEL NEJAYOTE COMO FUENTE
MICROBIANA Y NUTRITIVA EN *Opuntia ficus-indica***

TESIS

Que como requisito para obtener el grado de

LICENCIADO EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PRESENTA:

GUADALUPE JIMÉNEZ ROMANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. J. JESÚS HINOJOSA MOYA

El Salado, Tecamachalco, Puebla.

Diciembre del 2023

Cumpliendo con la presentación del protocolo y coloquio de tesis, así como las correcciones en el proyecto “**Aprovechamiento del Nejayote como Fuente Microbiana y Nutritiva en *Opuntia ficus-indica***” realizado por Guadalupe Jiménez Romano; el comité de evaluación y revisión autoriza la impresión de la tesis para los trámites en la obtención del grado de Ingeniero Agroindustrial.

El Salado, Tecamachalco, Puebla a 13 de noviembre del 2023

Comité de tesis

DR. J. JESÚS HINOJOSA MOYA
ASESOR Y VOCAL

MC. RAYMUNDO HERNÁNDEZ LOMA
PRESIDENTE

MC. ARMANDO M. TORRES CHOCOLATL
SECRETARIO



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Complejo Regional Centro
TECAMACHALCO

ASUNTO: AUTORIZACIÓN IMPRESIÓN DE TESIS

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de la Administración Escolar

Presente

Por este conducto me permito presentar a Ud. a la C. pasante de la carrera de Ingeniería Agroindustrial

GUADALUPE JIMÉNEZ ROMANO

Quién presenta como tema de tesis:

**APROVECHAMIENTO DEL NEJAYOTE COMO FUENTE
MICROBIANA Y NUTRITIVA EN *Opuntia ficus-indica***

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión física y digital correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

El Salado, Tecamachalco de la H. Puebla de Zaragoza., a 13 de noviembre del 2023

Director de Tesis
Dr. J. Jesús Hinojosa Moya

Dedicatoria

A mis abuelos

Martina Tepançal Castillo y Moisés Romano Calderón quienes en vida fueron grandes personas, hoy nos quedamos con las enseñanzas, bendiciones brindadas y la intención de poder honrarlos.

A mi madre

Juana Romano Tepançal, por no dejarme caer, motivarme a seguir preparándome, por todo tu cariño y amor.

A mis hermanas y sobrinas

Por acompañarme en las diferentes etapas de mi vida, cuidarme y hacer que siga aprendiendo nuevas cosas día a día.

A mis amigos

Aquellos que se convirtieron en mi segunda familia.

A mi mascota

Morita, que, aunque ya no esté con nosotros, siempre será recordada por su fidelidad para con su familia.

Agradecimientos

A la vida

Por permitirme haber llegado hasta aquí, porque soy una persona con salud, tengo una bonita familia y estoy rodeada de personas que se preocupan por mi e inexplicablemente me estiman, hoy tengo cosas que el dinero no puede comprar; lamentablemente hay seres que se nos adelantaron en el camino, aquellos que siempre vivirán en nuestros recuerdos, pero los que nos quedamos disfrutemos de todas las bellas y no tan bellas experiencias que nos ofrece esta vida.

A mi mamá y mis hermanas

Gracias por que a pesar de que la vida se puso difícil en algún momento ,seguimos perseverando como grandes mujeres, mamá nos enseñó a ser independientes y aunque no seamos tan expresivas sabemos que nos queremos a nuestra manera ; te agradezco Mami por apoyarme y no abandonarme cuando te necesite, eres un gran ejemplo a seguir; gracias Rosio e Isabel por las enseñanzas de hermanas mayores además de apoyarme, creo fielmente que las personas que hacen acciones buenas reciben recompensas en la vida por lo que son mis deseos para ustedes mis confidentes.

A mis sobrinos: Johanna, Emma, M. José, Eliam por enseñarme la inocencia del mundo, decirme que todo va estar bien que no me preocupe de la vida y a veces poder sentirme toda una superheroína ante ustedes.

A mis amigos

La familia que escogí, gracias por la compañía en esa época de soledad que sufrimos como foráneos, por las risas, peleas, tristezas, alegrías, momentos inolvidables que compartimos, por aceptarme tal cual soy, porque la escuela no era lo mismo sin ustedes, aprendí muchas cosas de cada uno y siempre voy a llevar un recuerdo de todos porque, aunque la vida nos separe hoy, algún día nos hemos de encontrar.

A mis profesores

Personas que ponen su dedicación para que nos preparemos durante este trayecto, a mi tutor el profesor Armando Torres Chocolatl de igual manera a la maestra Adriana, los profesores Raymundo, Héctor, José, Ramón, Juan Miguel por mencionar algunos en especial al Dr. Jesús Hinojosa Moya mi asesor de tesis quien me apoyo durante todo este proceso, el que me animó a seguir con este proyecto y desde el inicio no se dio por vencido conmigo cuando las cosas no salían como se esperaba, un profesor que siempre se esfuerza porque los alumnos realmente aprendan, una persona con un bonito espíritu que siempre te recibirá con una sonrisa.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Por haberme abierto las puertas, porque si no hubiera tenido la oportunidad de estudiar en el Complejo Regional Centro, sede Tecamachalco, no conocería a personas que hoy se han vuelto importantes en mi vida, porque a pesar de no estar cerca de la capital poblana, la BUAP siempre está presente y aunque seamos egresados jamás dejaremos de ser Lobos.

Resumen

El nejayote es un desecho contaminante, en México al año se producen 14.4 millones de m³ por el proceso de nixtamalización, este proceso requiere grandes volúmenes de agua, que son finalmente descargados al drenaje provocando un efecto ambiental negativo, por lo que esta investigación se enfocó en evaluar el posible potencial de este desecho como sustituto no químico en tratamientos pregerminativos de tuna (*opuntia ficus-indica*), además del aislamiento de microorganismos nativos del nejayote.

De cuatro tratamientos probados, se determinó que el tratamiento cuatro consistente en nejayote al 50% es una buena opción en el pretratamiento de las semillas de tuna roja, ya que la eficiencia de germinación obtenida fue de un 50% contrario al 6.66 % mostrados en la variedad verde, también en cuanto a crecimiento radicular la diferencia entre variedades fue notoria con un 8.4 mm de promedio general.

Los resultados fueron procesados mediante observaciones y pruebas estadísticas por lo tanto se concluye que de los dos tratamientos problema aplicados el tratamiento número cuatro (nejayote 50%) fue el que dio mejor respuesta en la variedad de tuna roja, todo gracias al remojo del desecho diluido además de la aplicación de la escarificación con lija; además de que se sentaron las bases de una biblioteca genética gracias al crecimiento de células transformadas.

Índice general

| | |
|---|----|
| 1. Aprovechamiento del Nejayote como Fuente Microbiana y Nutritiva en <i>Opuntia ficus-indica</i> | 16 |
| 2. Marco Teórico | 20 |
| 2.1. Método de cultivo | 20 |
| 2.2. Suelo y Fertilización | 22 |
| 2.3. Consumo y rubro económico | 24 |
| 2.4. El grano de maíz | 25 |
| 2.4.1. Pericarpio. | 26 |
| 2.4.2. Endospermo. | 27 |
| 2.4.3. Embrión/Germen. | 27 |
| 2.5. Nixtamalización | 29 |
| 2.6. Propiedades fisicoquímicas, nutricionales..... | 32 |
| 2.7. Tratamiento del nejayote..... | 34 |
| 2.8. Tratamientos pregerminativos..... | 35 |
| a) Estratificación: | 36 |
| b) Escarificación | 36 |
| c) Lixiviación: | 38 |
| d) Hormonas y otros estimulantes químicos:..... | 38 |
| 2.9. Antecedentes de investigación..... | 39 |
| 2.9.1. Nopal de castilla o Tuna de castilla (<i>Opuntia ficus indica</i>) | 39 |

| | |
|--|----|
| 3. Planteamiento del problema..... | 41 |
| 4. Justificación..... | 43 |
| 5. Objetivos | 45 |
| 5.1. General | 45 |
| 5.2. Objetivos específicos | 45 |
| 6. Hipótesis | 47 |
| 7. Metodología experimental | 49 |
| 7.1. Muestreo del maíz..... | 49 |
| 7.2. Preparación del nixtamal para recuperación del nejayote..... | 49 |
| 7.3. Germinación de semillas de <i>Opuntia ficus-indica</i> | 50 |
| 7.3.1. Siembra y prueba de tratamientos..... | 50 |
| 7.3.2. Porcentaje de germinación | 52 |
| 7.4. Aislamiento de microorganismos alcalófilos del nejayote..... | 52 |
| 7.4.1. Propagación de microorganismos | 52 |
| 7.4.2. Aislamiento | 52 |
| 7.4.3. Propagación microbiana para extracción de ADN genómico..... | 53 |
| 7.4.4. Extracción de ADNg | 53 |
| 7.4.5. Electroforesis en gel agarosa | 54 |
| 7.4.6. Preparación y carga de muestras | 55 |
| 7.4.7. Purificación del ADNg..... | 56 |
| 7.4.8. Digestión..... | 57 |
| 7.4.8.1. Digestiones enzimáticas | 57 |

| | | |
|-------------------------|--|-----|
| 7.4.9. | Clonación de los fragmentos de digestión | 58 |
| 7.4.10. | Transformación de células competentes | 59 |
| 8. | Resultados y Discusión | 61 |
| 8.1. | Determinación del tiempo de cocción..... | 62 |
| 8.2. | Preparación del sistema de germinado | 65 |
| 8.3. | Pre-germinado en semillas de <i>Opuntia ficus-indica</i> | 67 |
| 8.3.1. | Análisis ANOVA y Tukey, primera variable | 73 |
| 8.4. | Registros del desarrollo vegetal | 74 |
| 8.5. | Medición de crecimiento de las raíces | 76 |
| 8.5.1. | Análisis ANOVA y Tukey, segunda variable..... | 77 |
| 8.6. | Aislamiento de microorganismos alcalófilos del nejayote..... | 79 |
| 8.7. | Extracción gDNA..... | 81 |
| 8.8. | Reacción de degradación de RNA contaminante del gDNA | 83 |
| 8.9. | Reacciones mixtas de digestión del gADN..... | 86 |
| 8.10. | Clonación y transformación de células competentes | 87 |
| 9. | Conclusiones..... | 90 |
| 10. | Perspectivas..... | 92 |
| Anexos | | 93 |
| Anexo 1. | Explicación de análisis ANOVA y Tukey | 93 |
| Altura de las plántulas | | 96 |
| Anexo 2. | Determinación de la dureza del grano a través del índice de flotación en solución de azúcar comercial | 100 |

| | |
|--|-----|
| Anexo 3. Procedimiento de preparación de la disolución de azúcar al 67% | 101 |
| Anexo 4. Elaboración de PDA(Agar Papa Dextrosa) y medio líquido PDL (Líquida Papa Dextrosa). | 102 |
| Referencias | 104 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Abonado recomendado según la cantidad de hojas..... | 23 |
| Tabla 2. Abonados de cobertera recomendados para la generación de grano..... | 23 |
| Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas, nutricionales del nejayote..... | 32 |
| Tabla 4. Otras características del nejayote según diversos autores..... | 33 |
| Tabla 5. Parámetros contaminantes en el nejayote y sus valores máximos establecidos por normatividad..... | 35 |
| Tabla 6. Condiciones de los tratamientos en tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i>) roja y verde..... | 51 |
| Tabla 7. Mezclas de digestiones. *ADN genómico pretratado con RNasa..... | 57 |
| Tabla 8. Clasificación del maíz por su dureza mediante el índice de flotación y su correspondiente tiempo de nixtamalización. | 64 |
| Tabla 9. Comparativa del tiempo en días de germinación entre los dos tipos de tuna..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Tabla 10. Comparativa de los porcentajes máximos de germinación entre los dos tipos de tuna..... | 74 |
| Tabla 11. Comparativa del crecimiento de las raíces..... | 77 |
| Tabla 12. Secuencia del gel de electroforesis al 0.8% de la reacción de degradación de RNA contaminante..... | 84 |
| Tabla 13. Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos al día 44 de los registros de germinación..... | 93 |
| Tabla 14. Tabla Anova al día 44 de los registros de germinación..... | 94 |
| Tabla 15. Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 50-60 de los registros de germinación..... | 94 |
| Tabla 16. Tabla Anova a los días 50-60 de los registros de germinación..... | 94 |
| Tabla 17. Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 60-70 de los registros de germinación..... | 95 |
| Tabla 18. Tabla Anova a los días 60-70 de los registros de germinación..... | 95 |
| Tabla 19. Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 44 de los registros de altura..... | 96 |
| Tabla 20. Tabla Anova a los 44 días de los registros de altura..... | 97 |
| Tabla 21. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey para comparar el crecimiento aéreo a los 59 días del monitoreo vegetal..... | 97 |
| Tabla 22. Tabla Anova a los 59 días de los registros de altura..... | 98 |

| | |
|---|----|
| Tabla 23. Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey para comparar el crecimiento aéreo a los 85 días del monitoreo vegetal..... | 98 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabla 24. Tabla Anova a los 85 días de los registros de altura..... | 98 |
|--|----|

Índice de gráficas

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Comparación entre los porcentajes de germinación de tuna verde..... | 68 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Gráfica 2. Diferencias en los porcentajes de germinación de tuna roja..... | 71 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Gráfica 3. Comparación de alturas entre los tratamientos de tuna verde..... | 75 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Gráfica 4. Diferencia de alturas entre los tratamientos de tuna roja..... | 76 |
|--|----|

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura1. Ilustración del maíz..... | 21 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2. Mayores consumidores de maíz del mundo en 2018-2019..... | 24 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 3. Grano de maíz, vista exterior..... | 26 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4. Estructura interna del grano de maíz..... | 28 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 5. Pasos del proceso de nixtamalización..... | 31 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 6. Esquema mostrando el proceso de escarificación mecánica mediante el uso de pinza..... | 37 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 7. Método de cuarteo para la obtención de una muestra representativa..... | 49 |
| Figura 8. Mapa del vector de clonación empleado para la selección de clonas candidatas con los fragmentos de digestión para su secuenciación..... | 58 |
| Figura 9. Muestreo de maíz siguiendo las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-034/2002-SCFI..... | 62 |
| Figura 10. A) Maíces flotando en solución de azúcar; B) conteo de maíces flotantes, valor empleado para calculo posterior..... | 63 |
| Figura 11. Semillas de tuna pre lavadas y seleccionadas, colocadas en una superficie metálica de acero inoxidable para su secado..... | 66 |
| Figura 12. Preparación de soluciones para el tratamiento químico..... | 66 |
| Figura 13. Crecimiento en los tratamientos T2 y 3 a los 51 días de siembra respecto al control (TC)..... | 69 |
| Figura 14. Ubicación de los tratamientos 4 y 5, así como el crecimiento obtenido a los 51 días de siembra..... | 70 |
| Figura 15. Desarrollo de las plántulas de tuna roja de las semillas pretratadas el 31 de agosto del 2022. | 72 |
| Figura 16. Medición de las dimensiones de las plántulas con ayuda de un vernier..... | 74 |
| Figura 17. Comparación de raíces entre TC y T3..... | 78 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Diferencias entre tratamiento control contra el cuarto tratamiento..... | 78 |
| Figura 19. Tratamiento 2 y tratamiento 5 donde se muestra la longitud de las raíces..... | 78 |
| Figura 20. Desarrollo microbiano en el sustrato líquido, sobre nejayote incubado a temperatura ambiente durante dos meses..... | 79 |
| Figura 21. Desarrollo de hongos y bacterias en los diferentes medios para su posterior inoculación en medio líquido..... | 80 |
| Figura 22. Muestra la parte final del proceso de extracción de gDNA..... | 81 |
| Figura 23. Corrimiento del material genético suspendido en buffer de carga con dos colorantes para el control de los frentes base..... | 82 |
| Figura 24. Muestras el producto de la electroforesis sometida a voltaje constante en gel de agarosa al 0.8%..... | 83 |
| Figura 25. Muestras del gADN tratadas con RNasa A y producto de su electroforesis a voltaje constante en gel de agarosa al 0.8%..... | 84 |
| Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de reacción mixta..... | 86 |
| Figura 27. Placas mostrando el desarrollo de células candidatas positivas seleccionadas en los medios LB y PDA con antimicrobianos..... | 88 |

1. Aprovechamiento del Nejayote como Fuente Microbiana y Nutritiva en *Opuntia ficus-indica*

En México el cultivo de maíz es de suma importancia porque, es el alimento principal de la población, ocupa un porcentaje considerable de la población económicamente activa y tiene un alto valor agrícola. En 2016, el 52% de maíz blanco se destinó al consumo humano, 19% al consumo pecuario, 18% al autoconsumo, 6% a las exportaciones, 1% a semilla para siembra y el resto a mermas (4%) (SAGARPA, 2017). La nixtamalización es una técnica milenaria utilizada por los pueblos latinoamericanos para la elaboración de tortillas, harinas de maíz instantáneas, botanas y otras preparaciones tradicionales (Ramírez Jiménez, 2020). La industria de tortillas y snacks nixtamalizados ha ido en constante aumento en todo el mundo. Solo en EE. UU., las ventas proyectadas de tortillas se aproximan a 3,659 millones de dólares estadounidenses para 2023, mientras que per cápita el consumo en México promedio de 79.5 kg (Statista, 2020, como se citó en (Díaz Montes, 2016).

El proceso tradicional consiste en una cocción alcalina del grano entero utilizando 0.1-0.2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguido de un paso de maceración de 12 horas y de 2 a 3 lavados para eliminar el pericarpio y el álcali residual (Argun, 2017). Dicha agua de cocción, llamada nejayote, se desecha antes del lavado para eliminar los componentes solubles y el exceso de cal. Industrialmente, esta práctica genera una importante cantidad de residuos contaminantes con alta alcalinidad y demanda química de oxígeno. Se ha documentado que en México la producción promedio de aguas residuales por el proceso de nixtamalización es de unos 1500-2000 m^3 por día, lo que significa alrededor

de 1.2 millones de m³ al mes y en total 14.4 millones de m³ por año. Los sólidos solubles (50%) presentes en el nejayote están constituidos por proteínas, azúcares y vitaminas. La nixtamalización requiere grandes volúmenes de agua, que son finalmente descargados al drenaje, por lo que es importante desarrollar tecnologías que den un valor agregado a este desecho.

Por lo que se está evaluando y desarrollando nuevos métodos para reducir el efecto ambiental negativo del nejayote, ya sea mediante el uso de técnicas emergentes que minimizan el uso de agua y los flujos de desechos (Ramírez Jiménez, 2020). Otros usos que se le han dado al nejayote están encaminados a la recuperación de componentes de valor agregado alto, como fuente de enriquecimiento para alimentos funcionales (Acosta Estrada *et al.*, 2014 citado en Ramírez Jiménez, 2020) o como medio de cultivo para crecimiento de bacterias. Los microorganismos alcalófilos tienen la propiedad de crecer de manera óptima a valores de pH superiores a 9. Los microorganismos alcalófilos pueden ser aislados de muestras de suelo; sin embargo, es más fácil aislarlos de ambientes alcalinos. En las últimas décadas, el estudio de estos microorganismos ha cobrado importancia debido a la necesidad industrial de utilizar enzimas resistentes a medios alcalinos y al interés científico de determinar los mecanismos de adaptación a condiciones extremas de crecimiento.

Por otro lado, el nopal (*Opuntia sp.*) es un género vegetal importante en las tierras áridas y semiáridas, debido a su abundancia, su valiosa contribución a la dieta humana y su uso en la alimentación animal. También tiene un papel en el control de la desertificación. Los ensayos fisiológicos en plántulas de *Opuntia* y la comparación

entre especies son limitados debido a la falta de metodologías estimulantes en la germinación de sus semillas y su posterior desarrollo de plántulas.

Bajo el contexto anterior, esta investigación se enfocó en evaluar el posible potencial de este desecho como sustituto no químico en tratamientos pregerminativos de *Opuntia ficus indica*, además en el aislamiento de microorganismos nativos del nejayote.

Marco Teórico

2. Marco Teórico

El maíz (*Zea mays ssp. mays*) pertenece a la familia botánica Poaceae o Gramineae, así como el trigo. El arroz, la cebada, el centeno y la avena; fue mediante el proceso de domesticación que se originó el cultivo gracias a los antiguos habitantes de Mesoamérica, a partir del “teocintle”, una hierba parecida al maíz que crece naturalmente principalmente en México y partes de América Central (CONABIO, 2020). A México se le considera como el centro del origen de esta gramínea, ya que es muy probable que la mayor diversidad de maíz del mundo se concentre aquí.

Se considera que las poblaciones de teocintle del centro del México o los que crecen en el trópico seco de la Cuenca del Balsas pudieron ser los ancestros de los cuales se domesticó el maíz como planta cultivada (Kato, 1984 citado en CONABIO, 2020). El proceso de domesticación del maíz inició hace aproximadamente 10,000 años, muy asociada a la invención y desarrollo independiente de la agricultura en Mesoamérica, y continua en el presente con el manejo, cultivo y selección que hacen año con año los agricultores y sus familias de sus variantes de maíces nativos (o criollos), asimismo con la interacción de este cultivo con sus parientes silvestres, los teocintles, en las regiones donde coinciden de manera natural (CONABIO, 2020).

2.1. Método de cultivo

La planta del maíz es de aspecto robusto. Recuerda al de una caña. Tiene un solo tallo de gran longitud, sin ramificaciones, que puede alcanzar hasta cuatro metros de altura, es decir, poco más de la altura de dos hombres. Al hacerle un corte presenta una médula esponjosa. La planta tiene flores tanto masculinas como femeninas, la inflorescencia masculina es un espigón o penacho amarillo que puede almacenar de

veinte a 25 millones de granos de polen. La femenina tiene menos granos de polen, mil como máximo, y se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices.

Las hojas son largas y extensas, con terminación en forma de lanza, o lanceoladas, de extremos cortantes y con vellosidades en la parte superior. Sus raíces son fasciculadas, o sea, todas presentan más o menos el mismo grosor, y su misión es aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos pueden verse los nudos de las raíces a nivel del suelo (Frías, 2012).



Figura 1. *Ilustración del maíz.* Tomada de Francisco Manuel Blanco, Flora de Filipinas, Gran edición, Atlas II, 1880-1883.

Por otro lado, y a nivel genético, el maíz se poliniza de manera controlada para aprovechar alguna de sus características como la mayor producción de grano, por mencionar, los objetivos de estos cruzamientos van encaminados a la obtención de

altos rendimientos en producción. Por ello, se selecciona en masa aquellas plantas que son más resistentes a virosis, condiciones climáticas, plagas y que desarrollen un buen porte para cruzarse con otras plantas de maíz que aporten unas características determinadas de lo que se quiera conseguir como mejora de cultivo. También se selecciona según la forma de la mazorca de maíz, aquellas sobre todo que posean un elevado contenido de granos sin deformación.

2.2. Suelo y Fertilización

El maíz se adapta muy bien a todos tipos de suelo, pero suelos con pH entre 6 a 7 son a los que mejor se adaptan. También requieren suelos profundos, ricos en materia orgánica, con buena circulación del drenaje para no producir encharques que originen asfixia radicular. El maíz necesita para su desarrollo unas ciertas cantidades de elementos minerales. Las carencias en la planta se manifiestan cuando algún nutriente mineral está en defecto o exceso. Se recomienda un abonado de suelo rico en Potasio (K) y Fósforo (P). En cantidades de 0.3 kg de P en 100 Kg de abonado. También un aporte de nitrógeno N en mayor cantidad, sobre todo en época de crecimiento vegetativo. El abonado se efectúa normalmente según las características de la zona de plantación, por lo que no se sigue un abonado riguroso en todas las zonas por igual. No obstante, se aplica un abonado muy flojo en la primera época de desarrollo de la planta hasta que la planta tenga un número de hojas de 6 a 8 (CIBIOGEM, s.f).

A partir de esta cantidad de hojas se recomienda un abonado de acuerdo a la tabla1:

Tabla 1. *Abonado recomendado según la cantidad de hojas*

| Tipo de abono | Porcentaje mínimo requerido |
|--|-----------------------------|
| Nitrogenado (N) | 82 |
| Fosforado (P ₂ O ₅) | 70 |
| Potásico (K ₂ O) | 92 |

Durante la formación del grano de la mazorca, los abonados deben de ser mínimos. Se deben de realizar para el cultivo de maíz un abonado de fondo en cantidades de 825 Kg/ha durante las labores de cultivo. Los abonados de cobertera son aquellos que se realizan cuando aparecen las primeras hojas de la planta y los más utilizados se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. *Abonados de cobertera recomendados para la generación de grano*

| Tipo de abono | Cantidad a utilizar |
|---------------------------|---------------------|
| Nitrato amónico de calcio | 500 kg/ha |
| Urea | 295kg/ha |
| Solución nitrogenada | 525kg/ha |

Es importante realizar un abonado ajustándose a las necesidades presentadas por la planta de una forma controlada e inteligente. El estudio de los factores que determinan la capacidad de absorción de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el potasio y algunos micronutrientes es un tema de actualidad enfocado a incrementar la producción, especialmente en suelos ácidos y alcalinos, los cuales representan la mayor superficie cultivable del planeta (López Bucio *et al.*, 2003 citado en (CIBIOGEM, s.f.).

2.3. Consumo y rubro económico

La clasificación de los principales consumidores de maíz la encabezan los dos productores principales: Estados Unidos y China son de hecho dos de los países donde más se utiliza el cereal. Es más, en el caso de China, el consumo interno llega a superar la producción nacional (Todos los datos actualizados sobre la producción de maíz en el mundo, 2020).

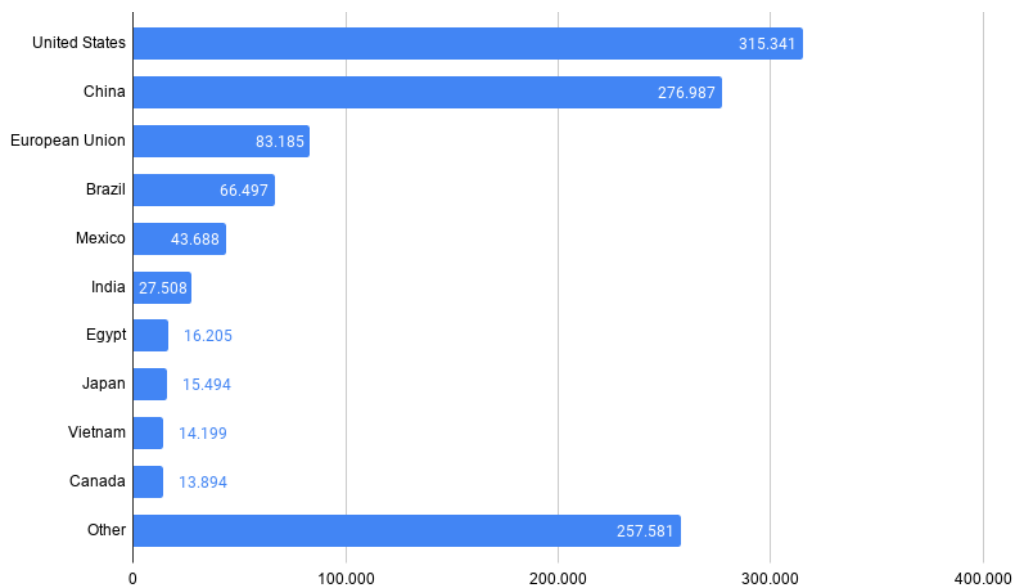


Figura 2. *Mayores consumidores de maíz del mundo en 2018-2019.* Datos en miles de toneladas: Statista

La Unión Europea confirma su papel importante en el consumo de maíz, seguida de algunos de los principales productores, Brasil, México, India y Canadá. Entre los demás grandes consumidores, podemos reconocer algunos de los mayores importadores: Egipto, Japón y Vietnam (Todos los datos actualizados sobre la producción de maíz en el mundo, 2020).

2.4. El grano de maíz

La calidad del grano de maíz está asociada tanto con su constitución física, que determina la textura y dureza, como con su composición química, que define el valor nutricional y las propiedades tecnológicas. La importancia relativa de estas características dependerá del destino final de la producción. Los mercados son cada vez más exigentes y se interesan por el contenido de proteínas, aminoácidos, almidón, aceites y demás componentes, y paulatinamente se reduce la tolerancia a sustancias contaminantes. Para las industrias que emplean grano de maíz, su calidad y propiedades tecnológicas son una preocupación fundamental. Se requieren granos sanos, limpios, de tamaño uniforme, textura y color (Bavera, 2006 citado en Maíz, *Zea mays*, 2013). Es uno de los cereales de mayor tamaño y que más se produce en el mundo. El fruto de la planta se denomina mazorca se llena de granos aplanados y grandes, colocados en ejes paralelos alrededor de su eje vertical. Los granos de maíz son cariósides desnudas, cuyas partes fundamentales son el pericarpio, el endospermo, el germen y el fenículo. El principal parámetro de clasificación es el color externo del grano (Maíz, *Zea mays*, 2013).

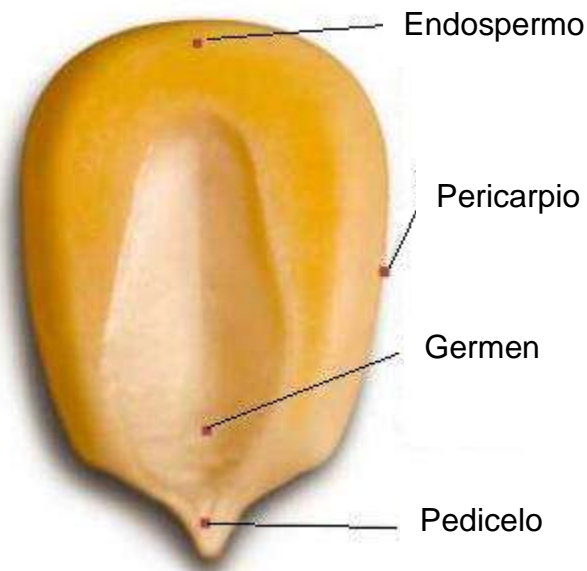


Figura 3. *Grano de maíz, vista exterior.* Adaptado de unam.mx, 2013, (http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=25).

2.4.1. Pericarpio. Constituye la parte externa del grano, siendo al 5-6% del total del peso del grano; es resistente al agua y al vapor. No es un alimento deseado por los insectos y los microorganismos (Maíz, *Zea mays*, 2013).

Está dividido en cuatro capas delgadas:

- Epicarpio. Capa externa que cubre el grano; está conformado por células de paredes gruesas.
- Mesocarpio. Capas constituidas por pocas células, siendo la capa externa la más gruesa, similar a la del epicarpio, mientras las células de las capas internas son planas, de paredes delgadas.
- Células cruzadas. Son capas de células de paredes delgadas, con muchos espacios intercelulares.

- Células tubulares. Son capas de células largas paralelas, sin ramificaciones.

2.4.2. Endospermo. En la mayoría de las variedades del maíz representa el aproximadamente 80-82% del total del peso del grano seco y es la fuente de almidón y proteína para la semilla que va a germinar. El almidón es usado en comidas (como combustible fundamental) para preparar edulcorantes, bioplásticos y otros productos (Maíz, Zea mays, 2013). El endospermo está compuesto por tres tipos de células:

- Capa de aleurona. De una sola célula, contiene proteína, aceite, minerales y vitaminas.
- El endospermo córneo. Formado por células de forma irregular y alargadas.
- El endospermo harinoso. Se localiza en la parte central del grano: está constituido por células grandes en relación a las otras células que componen el endospermo.

2.4.3. Embrión/Germen. Representa entre el 8 y el 12% del peso del grano.

Está conformado por:

- Escutelo. Órgano encargado de la alimentación del embrión en el momento de su germinación.
- Eje embrionario: conformado por una plúmula, que posee de cinco a seis hojas y una radícula.

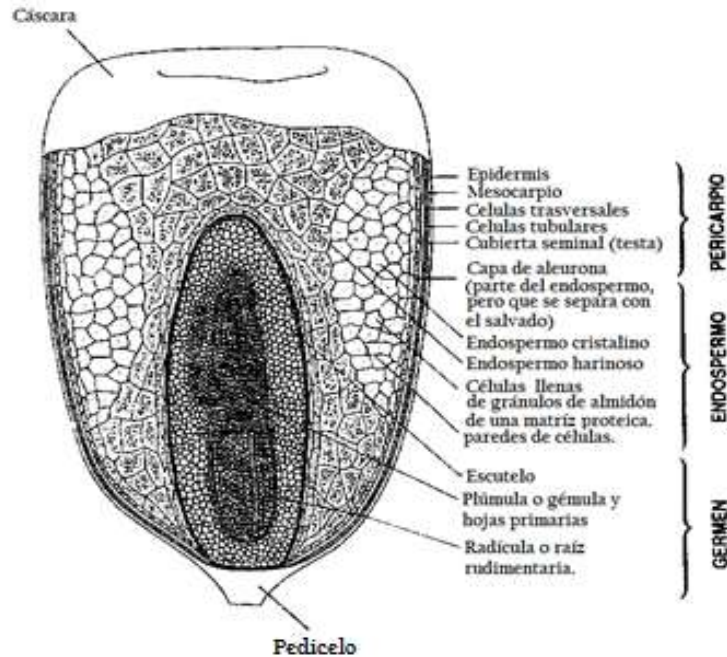


Figura 4. *Estructura interna del grano de maíz.* Adaptado de estructura interna del grano de maíz, por unam.mx, 2013. (http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=25).

A grandes rasgos, el grano del maíz es empleado básicamente en todo el mundo, como ya se ha mencionado para el consumo humano y nutrición animal, particularmente para elaborar diversidad de productos de consumo humano, es sometido a un proceso ancestral conocido como nixtamalización, en mencionado proceso, hoy en día ya industrializado, se enfoca claramente la atención en el grano tratado, sin embargo, se pierde el interés en la gran cantidad de desechos que se generan en mencionado proceso que a continuación se describe.

2.5. Nixtamalización

Siendo un método de procesamiento de maíz muy antiguo, la cocción alcalina ha sido desarrollada por las civilizaciones maya y azteca en Mesoamérica y su nombre tradicional se conoce como “nixtamalización”. Sin embargo, la demanda de esta práctica y de productos nixtamalizados aumenta en Asia y Europa (Arteaga, 2013, como se citó en Argún MS, 2017). Las civilizaciones maya y azteca desarrollaron el proceso de “nixtamalización” utilizando la solución que han generado con hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y la ceniza de madera que contiene minerales de Ca, K, Mg, Fe y Zn.

Durante el proceso tradicional de nixtamalización, los granos de maíz se cocinan en una solución de hidróxido de calcio a una temperatura cercana a la ebullición por un tiempo y, luego, los granos de nixtamal se remojan durante la noche en la misma solución de cal (Mariscal Moreno *et al.*, 2015 citado en Argún MS, 2017). La temperatura relativamente alta cerca del punto de ebullición y el pH alrededor de 12 facilitan varias conversiones de los componentes del maíz, como proteínas, lípidos y almidón. Para el proceso de cocción tradicional y ecológicamente realizado, dos veces el volumen de agua de peso de maíz o tres veces. Y en el método Clásico se utiliza cuatro veces (vol/peso) del peso del maíz (Mariscal Moreno *et al.*, 2015 como se citó en Argún MS, 2017).

Durante la cocción alcalina, entre el 0,5 y el 14,5 % del peso del grano pasa al agua. En esta parte pasada al agua se encuentran las capas de pericarpio, germen y endospermo (Rosentrater, 2006 citado en Argun, 2017) y, por tanto, contiene una elevada cantidad de carbono orgánico total (COT) aproximada a 59.836 mg/l. Hay compuestos fenólicos formados libres y ligados en diferentes proporciones,

dependiendo del tipo de maíz cocinado en nejayote. Los sólidos de nejayote contienen, respectivamente, 125 y 10 veces más ácido ferúlico libre y 15 y 53 veces más ácido ferúlico ligado en comparación con el maíz y del maíz nixtamalizado (masa). Además, el sólido de nejayote contiene, respectivamente, alrededor de 40 y 8 veces más capacidad antioxidante libre y 191 y 61 veces más capacidad antioxidante ligada en comparación con gránulos y masa sin procesar. Cuanto mayor sea el tiempo de cocción, mayor será el aumento de cantidad de amilosa que pasa de almidón a nejayote. Se ha reportado que una planta con una capacidad de 600 toneladas de maíz/día produce de 1.500 a 2.000 m³ de nejayote. Las propiedades fisicoquímicas y de aguas residuales del nejayote pueden variar según el tipo de maíz, la fuente/cantidad de calcio, los períodos de cocción y remojo para la nixtamalización (Argun, 2017).

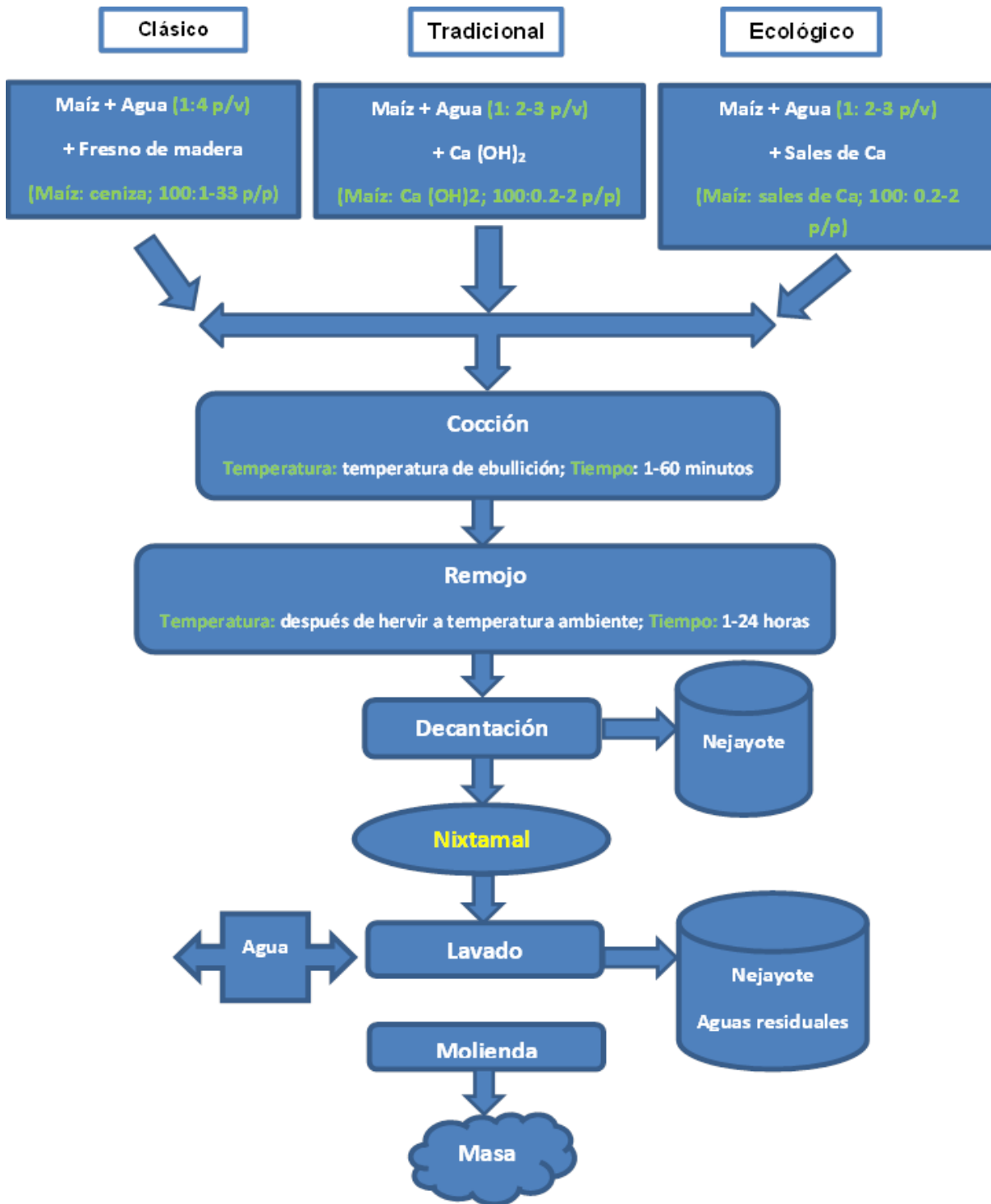


Figura 5. *Pasos del proceso de nixtamalización.* Adaptado de “Tratamiento y posibles alternativas de uso de un efluente especial: Nejayote” (p. 4), por Argún MS, 2017, Food Process Engineering.

2.6. Propiedades fisicoquímicas, nutricionales

Nutricionalmente, el nejayote tiene bajas concentraciones de proteína y grasa; sin embargo, es muy rico en carbohidratos (tabla 3). Estos son residuos propios de la composición del endospermo y pericarpio del maíz, tales como hemicelulosa, celulosa, almidón y lignina. Además, contiene sales de ácido trans-ferúlico, pcumárico, protocatecuico y 8,5-diferulico (Rosentrater y *col.*, 1999 citado en (Pérez, 2012)).

Tabla 3. *Propiedades fisicoquímicas, nutricionales del nejayote*

| Propiedad | Compuesto | % base seca |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Nutricional | Proteína soluble | 4.76-4.90* |
| | Grasa | 0.74-5.76* |
| | Carbohidratos | 71.93-75.41* |
| | Almidón | 2.57-32.0* |
| | Polisacáridos no amiláceos | 49.8-79.1* |
| | Fibra cruda | 19.29-22.77* |
| | Lignina | 0.36-0.67* |
| | Extracto libre de nitrógeno | 52.45-55.67* |
| | Proteína | 0.81-7.42* |
| | Grasa | 0.49-5.76* |
| | Cenizas | 1.09-12.66* |
| | Calcio | 4.68-13.13* |
| | Físicas | Densidad |
| Límite de elasticidad | | 1440.04-1618.08N/m ² |
| Contenido de humedad | | 88.15-89.29 |
| Actividad de agua | | 0.99 a 1.00 |
| pH | | 11.5 a 11.6 |

Datos tomados y modificados de la revisión de Rosentrater, 2006 citado en Pérez, 2012).

Así también el nejayote se encuentra compuesto, aparte de un alto contenido de calcio (tabla 3) por un 92 a 94% de agua y un 6 a 8% de residuos de maíz, entre los que figuran las partes del pericarpio, endospermo, germen, carotenoides cuyo papel es la responsabilidad del color amarillo característico del nejayote (Velazco M y col., citado en Pérez, 2012).

Tabla 4. *Otras características del nejayote según diversos autores*

| Características | Valores reportados |
|-----------------------------|---------------------|
| DQO (mg O ₂ /L) | 13,650.0 a 40,058.1 |
| ST (mg/L) | 13,310.0 |
| DBOs (mgO ₂ /L) | 7,875.0 a 14,218.7 |
| AT (mgCaCO ₃ /L) | 3,260.0 |
| Fosforo (mg/L) | 27 |
| N-Kjeldah(mg/L) | 118 |

DQO; Demanda Química de Oxígeno, SST; Solidos Suspendidos Totales, DBO; Demanda Bioquímica de Oxígeno, AT; Alcalinidad Total; b.s., Base Seca. Datos tomados y modificados de la revisión de (Canul, 2016).

Como se ha mencionado, el nejayote resulta ser un subproducto clasificado como desecho que afecta al medio donde se deposita, es un contaminante que puede ser aprovechado o sometido a un tratamiento secundario para reducir el impacto ambiental, de la misma manera, buscar o proponer diversas alternativas para aprovechar lo que en principio es un contaminante de alto riesgo. El fondo del presente trabajo es experimentar la posibilidad de aprovechar el nejayote con beneficios agrícolas como fuente directa o indirecta microbiana, promotora del

crecimiento vegetal, en la formulación de medios de cultivo vegetal o microbiano, y/o asentar las bases de otras posibilidades o estrategias experimentales

2.7. Tratamiento del nejayote

El programa sectorial de medio ambiente y recursos naturales 2020-2024 tiene como objetivo prioritario promover un entorno libre de contaminación del agua, el aire y el suelo que contribuya al ejercicio pleno del derecho a un medio ambiente sano para todos (Diario Oficial de la Federación, 2020). Sin embargo, actualmente el deterioro de la calidad de las aguas superficiales va en aumento gracias a los vertidos de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas no tratadas, los cuales no solo afectan a los ecosistemas naturales y su biodiversidad, sino que también amenazan la salud de la población que depende directamente de ellos.

En México, las descargas de aguas residuales se clasifican en municipales, abastecimiento público urbano y rural y no municipales, otros usos como industria autoabastecida. Según cifras oficiales, se trata el 52.7% de las aguas municipales que se generan, y el 32% de las aguas no municipales (Aguas residuales y contaminación en México, 2018).

Aunque hay avances, es aún insuficiente y existe un volumen indeterminado de aguas contaminadas que no son colectadas, que se pierden en las redes de desagüe o que se descargan de forma ilegal directamente al medio. Se calcula que en el 2015 el costo económico de la contaminación causada por aguas residuales no tratadas fue de 57 403 millones de pesos, equivalentes al 0.3% del producto interno bruto (Aguas residuales y contaminación en México , 2018).

Las Normas Oficiales Mexicanas, NOM-001-ECOL-1996 y NOM-002-ECOL-1996, establecen los límites máximos permisibles de contaminantes de las descargas de aguas residuales provenientes de la industria (Tabla 5). Los 8 compuestos orgánicos e inorgánicos y sus concentraciones en el nejayote son más altos con respecto a los límites permisibles de las Normas Oficiales Mexicanas y, por tanto, no puede ser arrojado al drenaje o alcantarillado sin previo tratamiento (Pérez, 2012).

Tabla 5. *Parámetros contaminantes en el nejayote y sus valores máximos establecidos por normatividad*

| Parámetro | Valores máximos por normatividad | Valores en nejayote** |
|---|----------------------------------|-----------------------|
| pH | 5-10* | 10.5-11.6 |
| Sólidos suspendidos (mg/L) | 60* | 5000-35000 |
| Demanda bioquímica de oxígeno (mg O ₂ /mL) | 60* | 190-7875 |

Datos tomados de las *NOM-001-ECOL-1996, *NOM-002-ECOL-1996 y **Rosentrater y *col.*, 2006 citado en Pérez, 2012.

Por otra parte, el desecho de maíz objeto del estudio será empleado en la evaluación como potencial agente individual o combinado en el tratamiento pregerminativo de semillas de plantas, para lo cual se incluye la siguiente información.

2.8. Tratamientos pregerminativos

En diversos trabajos se han desarrollado diversidad de tratamientos con semillas con la finalidad de eficientar el rendimiento planta-producción algunos de ellos consisten en la escarificación manual de la semilla, la inmersión en agua caliente o fría, en ácido sulfúrico, entre otros. Su finalidad es romper la latencia inducida por la testa al

ablandar, perforar, rasgar o abrirla para hacerla permeable sin dañar el endospermo y el embrión (Padilla, 1995 citado en Viveros, *et al.*, 2015). Algunos de ellos, aplicados en semillas de árboles, aceleran y aumentan su germinación; sin embargo, no todos los métodos y condiciones son eficientes para cualquier cultivo, por lo que se debe experimentar para determinar el más indicado para cada una (Viveros, *et al.*, 2015).

De entre los métodos más aplicados se pueden considerar la estratificación, escarificación, lixiviación, y los que se presentan a continuación:

a) Estratificación: Este tratamiento se utiliza para romper la latencia fisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, en frío o calor. La estratificación fría es aquella donde se mantienen las semillas a temperaturas bajas (4 a 10 °C), asemejando a las condiciones de invierno, por un período que oscila entre 20 y 60 días, llegando inclusive hasta 120 días (Varela & Arana, 2011). En el caso de la estratificación cálida, esta se basa en la necesidad de las semillas de estar sometidas a altas temperaturas para poder germinar. En este caso, la temperatura empleada oscila entre los 22 y 30 °C, con un período de estratificación entre los 30 y 60 días.

b) Escarificación. La escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases. Esta puede subdividirse en mecánica y química:

1) Mecánica: Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas (Figura 6). Si es a gran escala, se utilizan maquinas especiales como tambores giratorios recubiertos en su interior con papel lija, o combinados con

arena gruesa o grava. En el caso de tratar grandes cantidades de semillas, se puede utilizar una hormigonera con grava o arena en su interior, o bien en un tambor forrado en su interior con material abrasivo como lija, cemento o discos abrasivos giratorios.

Se han obtenido resultados óptimos con este tratamiento en semillas de Maitén, a las que se les ha eliminado el arilo mediante frotación con arena, logrando un 81% de germinación (Cabello & Camelio, 1996 citado en Varela & Arana, 2011).

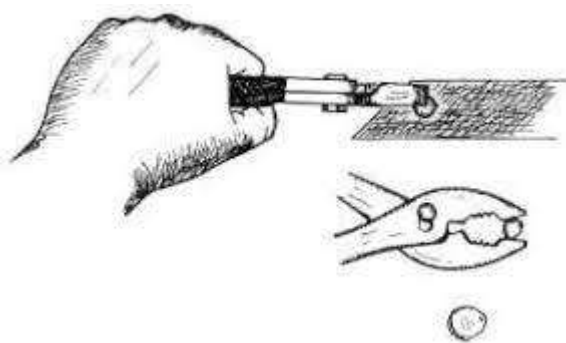


Figura 6. Esquema mostrando el proceso de escarificación mecánica mediante el uso de pinza. Tomado de Arriaga *et al.*, 1994 citado en (Varela & Arana, 2011).

2) La escarificación química, consiste en remojar las semillas por períodos breves de 15 minutos a 2 horas, en compuestos químicos. Las semillas secas se colocan en recipientes no metálicos y se cubren con ácido sulfúrico concentrado en proporción de una parte de semilla por dos de ácido.

Durante el período de tratamiento, las semillas deben agitarse regularmente con el fin de obtener resultados uniformes. El tiempo de tratamiento varía según la especie. Al final del período de tratamiento se escurre el ácido y las semillas se lavan con abundante agua para eliminar los excesos (Varela & Arana, 2011).

c) Lixiviación: Las semillas son remojadas en agua corriente con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta. Este tratamiento también es empleado con el objetivo de ablandar la testa. El tiempo de remojo puede ser de 12, 24, 48 y hasta 72 h, y en algunos casos, cambiándoles el agua con cierta frecuencia (Varela & Arana, 2011).

d) Hormonas y otros estimulantes químicos: Existen compuestos que estimulan la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico (GA_3), citokininas, entre otros. Todo este tipo de sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de la especie de que se trate.

Se ha mencionado que los métodos de pre tratamiento son diversos y, por lo tanto, los resultados son variados dependiendo de la semilla; para los fines de la presente investigación se han propuesto la experimentación con plantas de tuna.

2.9. Antecedentes de investigación

2.9.1. Nopal de castilla o Tuna de castilla (*Opuntia ficus indica*)

Una especie de rápida adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas, puesto que puede ser introducida a cualquier región del país, ya sea en climas templados-secos, áridos y semiáridos. Entre sus principales funciones son utilizadas para proteger el suelo de la erosión y restauración de los ya degradados. Esta cactácea juega un papel ecológico decisivo al frenar la degradación de los suelos deforestados en zonas áridas. Otra función muy importante es como planta alternativa para combatir la contaminación, ante el alto grado de perturbación ambiental como captadora de CO₂ por ser una de las pocas especies que pueden establecerse con éxito en superficies deterioradas (Narváez, 2016).

Las cactáceas tradicionalmente son propagadas a partir de semillas o cortes, en estos casos las plántulas tienden a ser de lento crecimiento y susceptibles a pudriciones. Con base en esto es importante plantear estrategias de conservación y protección mediante técnicas de cultivo de tejidos y almacenamiento de semillas que permitan la conservación de la especie indefinidamente.

Planteamiento del problema

3. Planteamiento del problema

Hoy en día se atraviesa por una situación climática preocupante, puesto que científicos de todas partes de mundo advierten de pocos años, o periodos de corto plazo, para tratar de restaurar el daño ambiental; si hablamos de nuestro país se sabe que es uno de los primeros donde está más cercana la hora cero en cuestión al agua, todo esto debido al consumo excesivo principalmente de empresas refresqueras y cerveceras; sin embargo, también existen otras actividades que empeoran esta situación, como es la elaboración de uno de los productos más consumidos en México, la tortilla, ya que el proceso de nixtamalización requiere una cantidad de agua importante, además de que el residuo producido combinado con agua, comúnmente llamado nejayote, produce un daño ambiental importante debido a que estas aguas residuales diariamente son desechadas sin tratamiento alguno a las tuberías o alcantarillado, provocando corrosión en los drenajes, además de que es un agua residual de alta alcalinidad alterando las formas de vida de los sitios donde tiene alcance.

Su composición en cuestión a materia orgánica residual (principalmente CaCO_3) junto con la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO) hacen que este efluente contaminante sea difícil de tratar. Razones por las cuales se deben buscar alternativas emergentes para su procesamiento y/o aprovechamiento total o parcial.

Justificación

4. Justificación

La experimentación empleando un desecho agroindustrial permitirá valorar su posible aprovechamiento como una alternativa en el pretratamiento de semillas de tuna (*Opuntia ficus-indica*) con la visión de mejorar aspectos de calidad germinal e incrementos en los rendimientos de producción valorándolo como posible sustituto o complemento no químico para el campo y, por otro lado, su posible empleo para el aislamiento de microorganismos favorables en la agricultura en la formulación de un biofertilizante, fuente de microorganismos con propiedades de interés industrial, además de la indudable justificación en mitigar el impacto ambiental que generan las grandes cantidades depositadas del mencionado desecho, garantizando una cadena alimentaria sana con el desplazamiento total o parcial de los fertilizantes y tratamientos químicos.

Objetivos

5. Objetivos

5.1. General

Aprovechar el nejayote, como fuente microbiana y nutritiva estimulante del crecimiento vegetal en semillas de *Opuntia ficus-indica*.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la aplicación de nejayote sobre la germinación en semillas de *Opuntia ficus-indica*.
2. Registrar los parámetros fisiológicos de las plántulas de *Opuntia ficus-indica*.
3. Aislar la población microbiana nativa del nejayote
4. Extraer y analizar el material genético.
5. Sentar las bases para la generación de una biblioteca genética.

Hipótesis

6. Hipótesis

El nejayote pudiera ser una fuente rica de microorganismos estimulantes de la división celular vegetal, con estos aportes podría ser un sustituto exitoso para la aceleración del proceso germinativo en *Opuntia ficus-indica*, idóneo para uso en campo y en la industria, su estudio molecular básico, permitirá sentar las bases científicas para su futura manipulación genética en pro de potencializar dichas propiedades.

Metodología

7. Metodología experimental

Toda la experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología del Complejo Regional Centro, sede Tecamachalco de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

7.1. Muestreo del maíz

Se utilizó el método de homogeneización por cuarteo establecido en la NMX-FF-034/2002-SCFI (figura 7), se consideraron los siguientes criterios: grano sano a la vista, sólido o no hueco.

El proceso consiste en extender los granos de maíz en un círculo y dividirlos en cuatro partes, desechar las dos fracciones opuestas y combinar las restantes, repitiendo el proceso hasta tener la cantidad de grano deseada (Rojas, 2018).

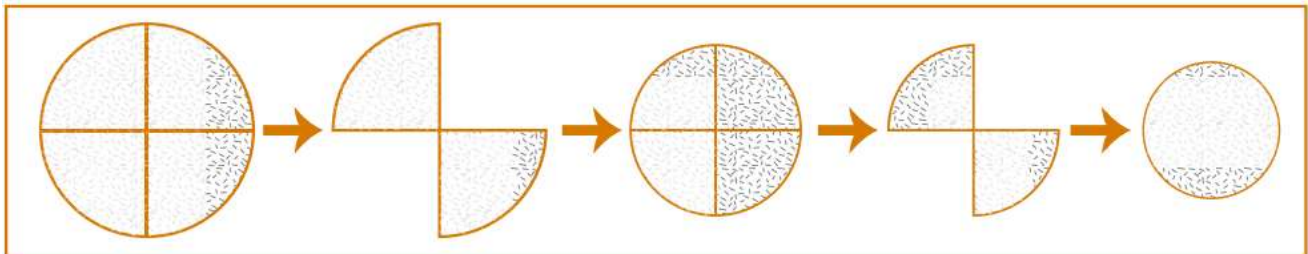


Figura 7. Método de cuarteo para la obtención de una muestra representativa.

De <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/19667/59829.pdf>

7.2. Preparación del nixtamal para recuperación del nejayote

Para la preparación del nixtamal se calcularon las cantidades y el tiempo de cocción de acuerdo a (Moreno & Gricelda Vázquez, 2006) en donde primeramente se calculó el índice de flotación con una disolución de azúcar al 67%, para poder determinar la

dureza del grano y posteriormente aplicar la fórmula para obtener el tiempo de cocción ideal, esto a partir de cuándo se inicia la ebullición plena; la relación de calcio y el agua a utilizar fueron obtenidos de (Moreno & Gricelda Vázquez, 2006); con los componentes se realizó la nixtamalización, transcurrido el tiempo se deja reposar 17 horas y pueda servir para la molienda.

7.3. Germinación de semillas de *Opuntia ficus-indica*

7.3.1. Siembra y prueba de tratamientos

Para la siembra se esterilizaron las charolas de germinación, se llenaron hasta la tercera parte de su capacidad con el sustrato de suelo previamente esterilizado y recolectado en la periferia de la unidad académica, el suelo esterilizado dos veces a condiciones de 12 libras de presión durante 30 minutos se mezcló con vermiculita igualmente esterilizada bajo las mismas condiciones.

Se regaron los contenedores con agua normal para conservar humedad suficiente, sin la aplicación de ningún agente químico, en la mezcla del sustrato se sembraron las semillas tratadas de *Opuntia ficus-indica* a una profundidad de un centímetro.

Para los tratamientos se utilizaron dos variedades de semillas de tuna (*Opuntia ficus-indica*), la primera cuya carne es color verde pálido y el segundo color rojo, se utilizaron sustancias como peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico y la muestra problema de nejayote, los tratamientos se muestran a continuación (tabla 6):

Tabla 6. *Condiciones de los tratamientos en tuna (Opuntia ficus-indica) roja y verde*

| Nº tratamiento | Escarificación | Tipo de tratamiento | Concentración % (v/v) |
|----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| T1 | - | - | - |
| T2 | lijado | Peróxido de hidrogeno | 3.0 |
| T3 | lijado | Nejayote | 100.0 |
| T4 | lijado | Nejayote | 50.0 |
| T5 | - | HCl | 2.0 |

Cada tratamiento fue realizado por veinticuatro horas y por triplicado; T1 corresponde al tratamiento control que consistió en sembrar las semillas directamente sin ninguna alteración. Se experimentó con tuna roja y verde, cada grupo de semillas tratadas de acuerdo a la tabla 6 fueron sembradas en dos contenedores independientes.

- Verde: el diseño fue completamente al azar, con 30 repeticiones de 60 semillas para cada tratamiento, lo que dio un total de 244 semillas incluyendo al tratamiento testigo.
- Roja: diseño al azar con 8 repeticiones de 16 semillas por tratamiento, a excepción del testigo, el total fue de 140 semillas.

Al experimentar dos tiempos de remojo, se montó una charola de germinación por cada tiempo de tratamiento, es decir, dos charolas.

7.3.2. Porcentaje de germinación

La eficiencia germinal porcentual se estimó aplicando la ecuación básica siguiente:

$$\% \text{ germinación} = \frac{N^{\circ} \text{ semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ total de semillas sembradas}} * (100)$$

Tras la germinación, tres meses después se realizó la determinación de altura de las plantas, así como al término del experimento se midió la longitud de las raíces.

7.4. Aislamiento de microorganismos alcalófilos del nejayote.

7.4.1. Propagación de microorganismos

Durante dos meses se dejaron reposar dos frascos conteniendo 50mL de nejayote, el primero con la parte líquida del nejayote y el segundo con los lodos del nejayote crudo, la estimulación microbiana se logró a temperatura ambiente durante el periodo indicado.

7.4.2. Aislamiento

Mediante extensión en placa se sembraron los microorganismos del líquido sobrenadante del nejayote, los sedimentos sólidos, y nejayote combinado, sólido-líquido, en tres diferentes medios, PDA pH 5.6, PDA pH 3.5 y agar para métodos estándar, las placas se incubaron a 37°C durante cinco días y posteriormente fueron preservadas a 4°C. Para los siguientes ensayos se trabajó con tres muestras representativas finales que consistían en nejayote combinado en su fase sólida-líquida.

7.4.3. Propagación microbiana para extracción de ADN genómico

Logrado el desarrollo microbiano monitoreado por el incremento en la turbidez, se inocularon en medios líquidos, sustituyendo al medio PDA por PDL, y al agar para métodos estándar, por medio LB, las muestras fueron etiquetadas e incubadas a 28°C hasta que se presentó un buen crecimiento el cual fue recuperado por microcentrifugación. El paquete celular fue procesado y/o almacenado siguiendo el protocolo de extracción de DNA genómico (gDNA).

7.4.4. Extracción de ADNg

Este ensayo consistió en compactar las células microbianas mediante centrifugación y la eliminación del caldo de cultivo. Las pastillas celulares recuperadas se sometieron a un tratamiento químico para su lisis celular, separar y purificar los ácidos nucleicos del resto de componentes de la célula (azúcares, proteínas, lípidos y glúcidos). Para la extracción de ADN hay que tener en cuenta que el protocolo a emplear debe ser acorde al tipo de microorganismo que se analizará (Carrasco, Ortiz, S, & F, s.f.)

Las tres muestras que fueron colocadas en tubos eppendorf; la muestra número uno (PDL pH6.5), muestra número dos (PDL pH3.5) y la muestra número tres (LB). Las cuales se centrifugaron a 13000 RPM para eliminar el sobrenadante, posteriormente se le adicionaron 200µL de agua destilada para que con ayuda de pistilos se maceraron, se incubaron 10 minutos a 80°C, enseguida se colocaron en el termoblock a una temperatura de 65°C durante 3 minutos, transcurrido el tiempo se adicionaron 800µL de buffer de lisis(50 mM Tris base, 250 mMNaCl, 50 mM EDTA (pH 8,0), 0,3% dodecil sulfato sódico dodecil sulfato (SDS) (p/v) (Tapia-Tussell, 2006); se incubaron

nuevamente 30 minutos a 65°C; se agregaron 500 µL de cloroformo mezclando por inversión durante 5 minutos. Se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 RPM a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante en, al cual se le adicionó 0.7 volúmenes de isopropanol mezclando por inversión, posteriormente se colocaron a 80 °C por 10 minutos; nuevamente se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 RPM y temperatura ambiente, con cuidado, se descartó el sobrenadante, posteriormente se adicionó 500µL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar 5 minutos a 13000 RPM desechando el sobrenadante. Las pastillas fueron secadas a condiciones ambientales; para finalizar las pastillas se resuspendieron en 30 µL de agua MQ para su posterior análisis visual.

7.4.5. Electroforesis en gel agarosa

La electroforesis es una técnica que consiste en separar partículas con carga, en este caso fragmentos de ADN, cuando son sometidas a un campo eléctrico. Para esto, se utiliza una matriz de agarosa, generalmente entre 0,8 y 1,5%, en una solución amortiguadora, además de una tinción que se intercala en el ADN para permitir su visualización. A dicha matriz se le aplica un flujo de electricidad suministrado por una fuente de poder, en la cual se establece el voltaje y tiempo en que se aplica el campo eléctrico. La migración de los fragmentos de ADN que poseen carga negativa, se produce hacia el electrodo positivo, ubicado en el otro extremo de la cámara. Finalizada la migración de los fragmentos, las bandas de ADN se visualizaron en el gel de agarosa al 0.8% aplicando luz ultravioleta (UV) con un transiluminador acoplado a un fotodocumentador, en primera instancia, para evaluar la integridad del ADN

extraído desde la colonia microbiana y, en segunda instancia, para corroborar la amplificación de ADN mediante PCR (Carrasco, Ortiz, S, & F, s.f.).

Como se mencionó se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 0.5X, calentando a ebullición hasta su total integración; la solución se dejó aclimatar y se vertió en el molde complementado con un peine de cinco muestras para formar los pocillos, esto de acuerdo al número de muestras que se trabajaron, mientras ocurría la solidificación del gel se preparó la cámara de electroforesis la cual se llenó con buffer de corrimiento TBE 0.5X, fue conectada a la fuente de poder; una vez preparado se colocó el gel dentro de la cámara para su corrimiento en ciclos de 30 minutos a 70 volts.

7.4.6. Preparación y carga de muestras

Para la carga de muestras fue necesario colocar una cantidad mínima de colorante, llamada solución de carga, las muestras se resuspendieron varias veces con ayuda de la micropipeta; una vez preparadas las muestras, se colocaron cuidadosamente en los pozos del gel; se ajustó el voltaje y tiempo, transcurriendo este, el gel se sometió a una tinción con bromuro de etidio (BrEt), revelando su posición en el gel después de ser enjuagado para visualizarlo con el transiluminador- fotodocumentador.

7.4.7. Purificación del ADNg

Las muestras de ADNg que acumularon restos de RNA residual fueron tratadas en una reacción degradativa llamada Master Mix, para lo cual primero se colocaron, por cada muestra de ADNg, de 1 a 3 μL de RNAsa A a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de 10 a 12 μL de agua MQ, cantidades variables dependiendo de la concentración de cada muestra, y de 12 a 15 μL del ADNg a tratar. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2 horas, seguido de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Si la reacción fue exitosa, se procedió al fraccionamiento del material genético mediante reacciones de digestión enzimática de reconocimiento sitios específicos.

7.4.8. Digestión

7.4.8.1. Digestiones enzimáticas

Las reacciones de restricción se realizaron con los enzimas *EcoRI*, *XhoI* y *EcoRV* (20 U/ μ l), aplicando los amortiguadores correspondientes (10X buffer 4 de BioLabs). Se prepararon las mezclas de reacción a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 ml, como a continuación se presenta (tabla 7):

Tabla 7. Mezclas de digestiones. * ADN genómico pretratado con RNasa. Las cantidades fueron escaladas según el número de reacciones requeridas, normalmente fueron tres (3X)

| Componente | 1X (μ l) | 1X (μ l) |
|---------------------|---------------|---------------|
| *ADNg | 2.0 | 2.0 |
| <i>EcoRI</i> | 0.8 | 0.8 |
| <i>EcoRV</i> | 0.0 | 0.8 |
| <i>XhoI</i> | 0.0 | 0.8 |
| Amortiguador 10X | 2.0 | 2.0 |
| RNasa | 0.8 | 0.8 |
| H ₂ O dd | 16.4 | 12.8 |
| Volumen final | 20 | 20 |

Los tubos se incubaron en un baño seco a 37 °C de 2 a 15 horas. Transcurrido el tiempo, los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.4.9. Clonación de los fragmentos de digestión

Los productos de las digestiones fueron ligados en el vector de clonación comercial pDrive de QIAGEN (figura 8) siguiendo las especificaciones de la marca. Fueron empleados de 1 a 2 de las reacciones de digestión purificadas al que se le agregó 0.5 μ l del vector (50 ng/ μ l) y 2.5 μ l de su amortiguador de clonación a 2X; los componentes fueron mezclados suavemente con apoyo de la micropipeta y las reacciones fueron incubadas a 16 °C por 30 minutos. Con los productos de las ligaciones se transformaron células químicamente competentes *E. coli* DH5 α .

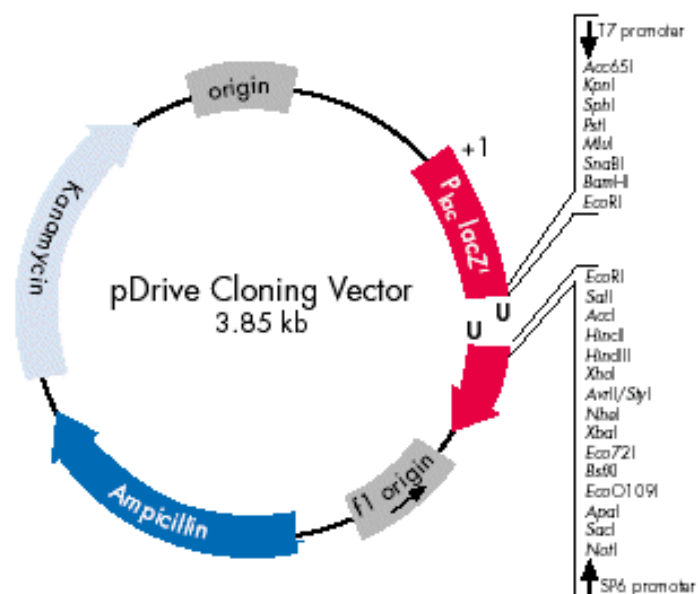


Figura 8. Mapa del vector de clonación empleado para la selección de clonas candidatas con los fragmentos de digestión para su secuenciación.

7.4.10. Transformación de células competentes

La reacción se desarrolló adicionando de 1 μ L de las reacciones de clonación a las células (DH5 α) mantenidas a 4°C, el mix se incubó a la misma temperatura durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se aplicó un choque térmico a 42°C por un minuto y medio; se incubó nuevamente 5 minutos a 4°C; se les adicionó 500 μ L de medio LB sin antibióticos, se incubó una hora a 37°C en agitación orbital; pasado el tiempo se centrifugó a 13,000 RPM durante 3 minutos y se eliminó el exceso de medio con ayuda de micropipeta, la pastilla fue resuspendida en el medio restante para proceder a sembrar las bacterias transformadas por la técnica de extensión en placa sobre medio LB con 100 ng/mL de kanamicina como agente de selección soportado por los reactivos de alfa complementación. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C durante una noche para su análisis y extracción de DNA plasmídico que sería mandado a secuenciación.

Resultados y Discusión

8. Resultados y Discusión

Esta investigación consistió en evaluar al nejayote crudo como agente de tratamiento para acelerar la germinación de semillas de tuna (*Opuntia ficus indica*), así como en el aislamiento de microorganismos propios de este desecho empleados en la construcción de su biblioteca genómica; una vez que se logró el aislamiento y la propagación de los mencionados microorganismos, se realizó la extracción de su material genético (ADNg) como base de la digestión produciendo fragmentos empleados en construcción de la biblioteca, además de la amplificación de genes de referencia por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); los resultados del trabajo se presentan a continuación.

Siendo el nejayote uno de los elementos empleados durante toda la experimentación, fue esencial disponer siempre de él, por lo tanto, se recurrió a su preparación siguiendo el proceso de nixtamalización tradicional que consistió en aplicar al maíz óxido de calcio (CaO) al 1% siguiendo las indicaciones de cocción y muestreo previo (figura 9) reportados por (Moreno & Gricelda Vázquez, 2006); para la posterior recuperación del llamado efluente. El maíz utilizado fue almacenado en un garrafón de plástico para evitar humedecimiento, la nixtamalización se llevó a cabo en el laboratorio de procesos del Complejo Regional Centro, sede Tecamachalco de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Figura 9. *Muestreo de maíz siguiendo las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-034/2002-SCFI.*

Como se sabe, las condiciones de nixtamalización son variables dependiendo algunas características de las semillas, por mencionar la edad, dureza, variedad, entre otras. Por lo tanto, nos vimos a la tarea de determinar el tiempo específico de cocción para las semillas disponibles por donación del profesor Armando Torres Chocolatl como se describe a continuación.

8.1. Determinación del tiempo de cocción

El tiempo de cocción es un factor crítico durante la nixtamalización, es variable porque este tiempo se determina con base en la experiencia de manera empírica mediante variables cualitativas como el desprendimiento del pericarpio con los dedos (Roque Maciel, 2016). La dureza del grano de maíz es el principal factor a considerar al momento de definir el tiempo de nixtamalización que se le dará al grano. En este sentido, Gómez (1993) desarrolló un modelo matemático que relaciona la dureza del

grano medida mediante el índice de flotación (IF) con el tiempo óptimo de nixtamalización, la expresión de dicho modelo es:

$$TC = 49.131 - 0.267(IF)$$

Dónde, TC es el tiempo de cocimiento

Siguiendo la ecuación anterior, se realizó la determinación de TC a través del índice de flotación (IF) en solución de azúcar comercial al 67% como se observa en la (figura 10). No está de más mencionar que la aplicación de la solución de azúcar con la misma densidad a la de una solución de nitrato de sodio al 41% brinda resultados similares al método oficial desarrollado.

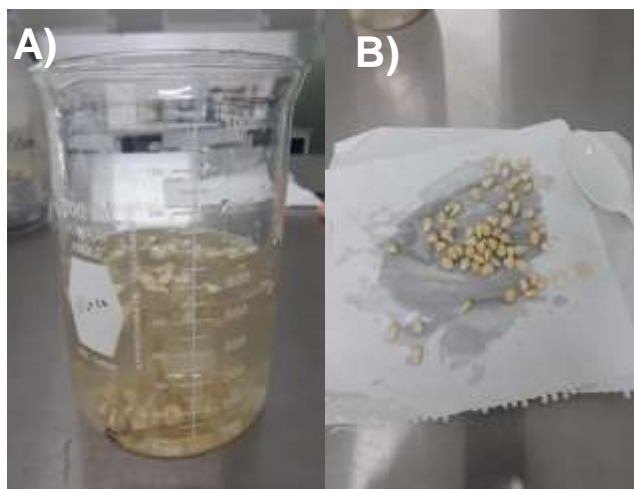


Figura 10. A) Maíces flotando en solución de azúcar; B) conteo de maíces flotantes, valor empleado para calculo posterior.

Se espera que, aplicando la ecuación presentada en la determinación del tiempo de cocción, el número de granos flotantes en la disolución con mayor dureza, arroje un menor índice de flotación. Esta metodología permite determinar la dureza de todo tipo

de granos de maíz, permitiendo su clasificación en granos suaves, intermedios, duros y muy duros (tabla 8), asignando un tiempo de cocción para los procesos de nixtamalización en función de dicha dureza (Moreno & Gricelda Vázquez, 2006). Durante el cocimiento del grano de maíz se produce un aumento de humedad, la cual se eleva en 10 g /100 g más, durante el reposo. Arámbula Villa G. en el 2001 afirmó que durante el reposo se presentan los fenómenos de difusión del agua al interior del grano, origina cambios bioquímicos en su estructura molecular, modificando las características fisicoquímicas, reológicas y texturales del nixtamal, masa y tortillas, por esta razón es importante definir correctamente el tiempo de cocción, ya que la riqueza nutricional del efluente estará comprometida.

Tabla 8. *Clasificación del maíz por su dureza mediante el índice de flotación y su correspondiente tiempo de nixtamalización*

| Índice de flotación | Clasificación* | Tiempo de nixtamalización (minutos) |
|---------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 0-12 | Maíces muy duros (MD) | 45 |
| 13-37 | Maíces duros (D) | 40 |
| 38-62 | Maíces intermedios(I) | 35 |
| 63-87 | Maíces suaves (S) | 30 |
| 88-100 | Maíces muy suaves (MS) | 25 |

MD=muy duro; D=duro; I=intermedio; S=suave; MS=muy suave. Información tomada de la revisión de Moreno & Gricelda Vázquez, 2006.

Bajo el contexto anterior y ejecutando la experimentación descrita, el tiempo de cocción resultante fue de treinta y dos minutos, por lo que haciendo el comparativo con la (tabla 8), la materia prima empleada en la preparación del nixtamal fue clasificado como maíz de dureza intermedia.

Una vez estandarizadas las condiciones, se procedió a nixtamalizar 2 Kg de maíz, el cual previamente se muestreó con el método mencionado en el apartado (7.1) para ello se vertieron 4 L de agua potable y 20 g de óxido de calcio (CaO) de grado alimenticio en un recipiente de acero inoxidable sin tapa colocado en una estufa fabricada en acero inoxidable y con una flama ajustada al mínimo. El tiempo de cocimiento se basó en el tiempo total en que se desprendió el pericarpio del grano. El desprendimiento del pericarpio se determinó de forma subjetiva, seleccionando tres granos de manera aleatoria de cada muestra tomada en intervalos de 5 minutos durante tres cuartos de hora. Con el producto de nixtamalización preparado se conservó a 4°C hasta el momento de emplearlo como agente en el pretratamiento de semillas de tuna y sus posteriores registros en las respuestas germinativas.

8.2.Preparación del sistema de germinado

Las dos variedades de tuna fueron adquiridas del mercado del municipio de Tecamachalco, los frutos fueron cultivados y cosechados en agosto del año 2022, donde la producción de tuna es alta en San Sebastián Villanueva, Puebla. Los frutos fueron transportados al laboratorio de agrobiotecnología 103 y 104 del CRC-Tecamachalco donde fueron procesados para la recolección de la semilla, para ello con apoyo de utensilios de cocina, como el cuchillo, coladera de plástico; la pulpa y la cáscara fueron descartadas, el exceso de pulpa en las semillas fue eliminada

enjuagando al corro de agua de la llave y agua purificada para proceder con el secado de las semillas que fueron colocadas en charolas de aluminio para su secado a 37°C durante veinticuatro horas (figura 11).



Figura 11. *Semillas de tuna pre lavadas y seleccionadas, colocadas en una superficie metálica de acero inoxidable para su secado.*

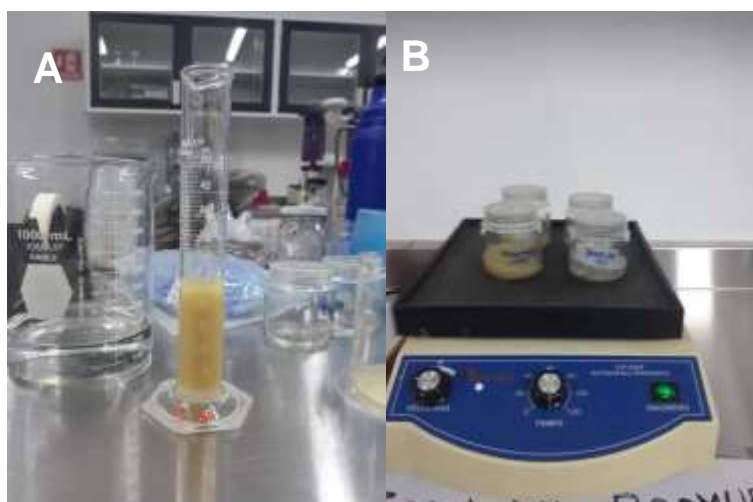


Figura 12. *Preparación de soluciones para el tratamiento químico. (A); semillas sumergidas en contenedores y colocadas en agitación por tiempos definidos, para los detalles consultar la tabla 6 (B).*

Las semillas tratadas, como ya se ha venido mencionando, apartado (7.3) de la metodología, tabla 6, fueron secadas con ayuda de papel absorbente para eliminar el exceso de las soluciones y proceder a su siembra y germinación.

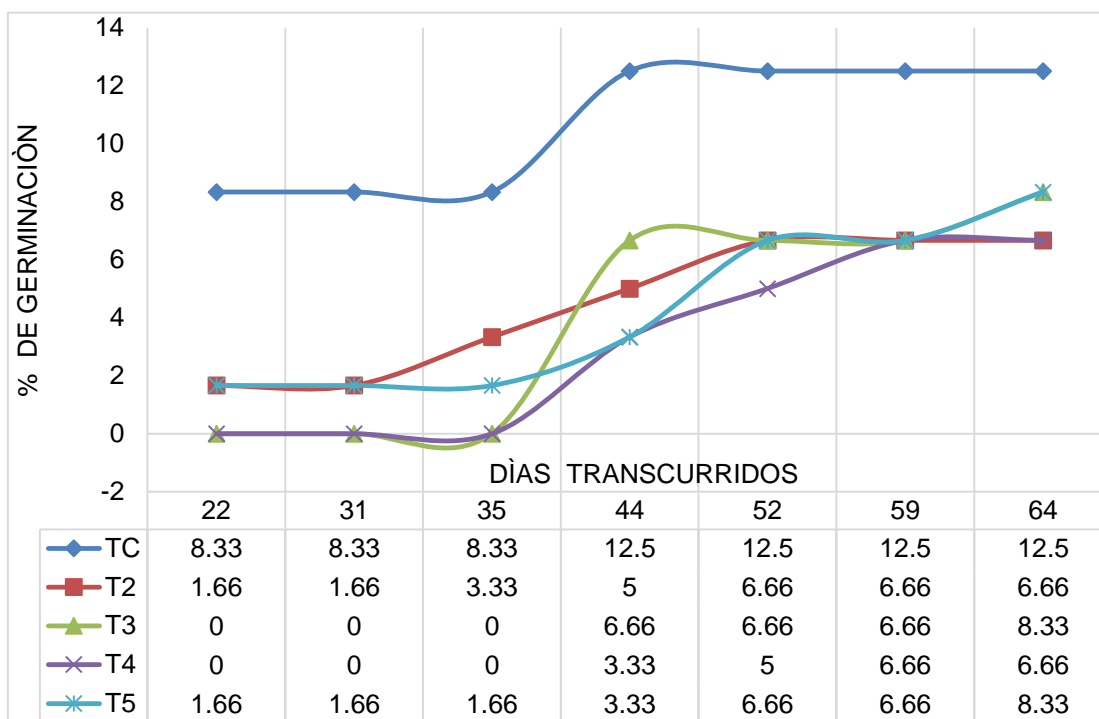
8.3.Pre-germinado en semillas de *Opuntia ficus-indica*

Las semillas pretratadas y secas fueron colocadas en charolas de germinación sobre un sustrato preparado consistente de una mezcla de vermiculita y tierra en relación 70:30; dichas charolas fueron ubicadas en un espacio del laboratorio a condiciones de temperatura, luz y humedad variable dependiendo el día, condiciones que oscilaban entre 25 a 37°C, 10 a 400 luxes, día noche, respectivamente, y humedad relativa del 30 a 40%. Las semillas fueron regadas cada 5 días durante 30 días hasta observar la aparición de brotes, registrando los siguientes valores:

Tuna verde

La siembra de semillas pretratadas se realizó el 22 de agosto del año 2022, como se observa en la gráfica 1 después de 22 días de sembrado, se evaluó la germinación de los tratamientos problema para poder hacer la comparación obteniendo un 0% de germinación en T3 y T4, así, transcurrió hasta el día 52 en donde respondieron las semillas con un porcentaje del 6.66% en el T3 y uno del 5% en T4.

Gráfica 1. Comparación entre los porcentajes de germinación de tuna verde



TC es la asignación para el tratamiento control, y los códigos T2 a T5 corresponden al número de tratamiento.

En la gráfica 1 se observa que el TC tuvo un mayor porcentaje de germinación respecto a los demás. El T2 y el T5 presentó un porcentaje idéntico de 6.66% hasta el día 59; posteriormente el día 64 el T5 alcanzó un 8.33% de germinación, igualando al T3. Fue hasta el día 64 cuando se presentó un porcentaje de germinación de 8.33% en el T3 y uno de 6.66% en el T4; por lo que se considera al T3 (nejayote 100%+ lijado) como aquel que tuvo un mayor porcentaje de plántulas germinadas con una buena rigidez, presencia de hojas y espinas.

Siguiendo con la comparación de tratamientos, el tratamiento control (TC) mostró una ventaja del 4.17 % en comparación al T3 (nejayote 100%) como se observa en la

(gráfica 1) esto desde los primeros 22 días de siembra por lo que se da razón al artículo de (Vázquez, 2016) en donde menciona que los métodos pre germinativos se aplican a semillas de especies silvestres y domesticadas en las cuales la escarificación asegura la germinación y emergencia de las plántulas (Celis Velázquez *et al.*, 2008 a, b; Celis Velázquez *et al.*, 2010), pero este no fue el caso de las semillas de *Opuntia*, ya que su latencia y dureza de la testa (Orozco-Segovia *et al.*, 2007) impidió al embrión emerger fácilmente. Por lo anterior, la germinación que se obtuvo no fue la más deseada, por lo que la prueba con tetrazolio parece la más adecuada para conocer la viabilidad y el vigor de los embriones de *Opuntia* para mejora de la germinación y futura siembra de acuerdo a lo que menciona (Vázquez, 2016).

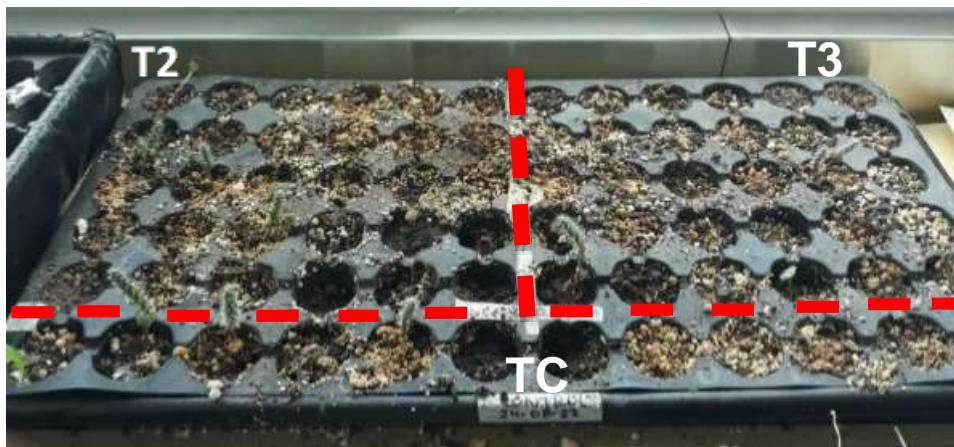


Figura 13. *Crecimiento en los tratamientos T2 y 3 a los 51 días de siembra respecto al control (TC).*

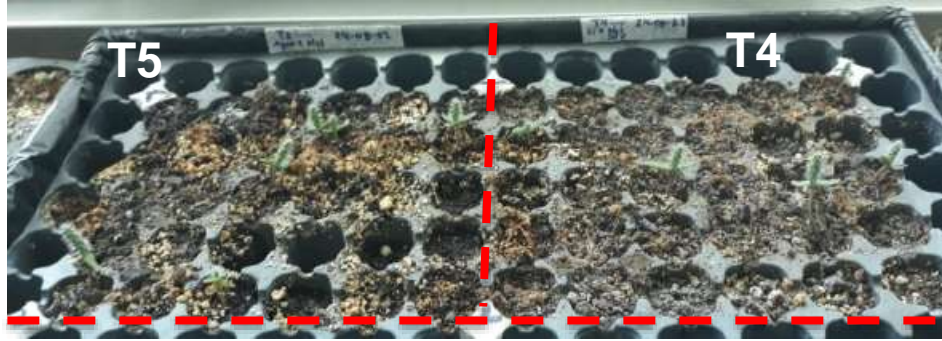
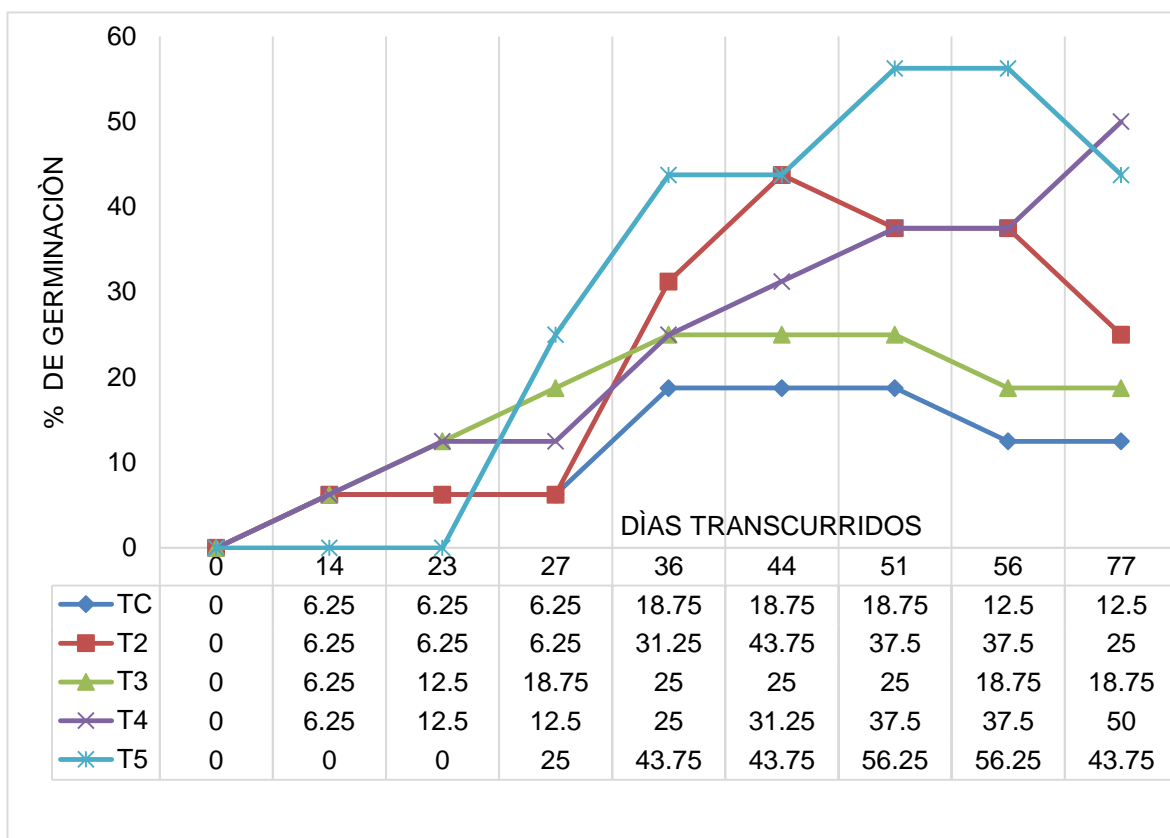


Figura 14. *Ubicación de los tratamientos 4 y 5, así como el crecimiento obtenido a los 51 días de siembra.*

Con las observaciones finales y por todo lo anterior (figura 14) podemos sugerir el cambiar las condiciones de los tratamientos, la concentración del efluente, así como los tiempos de reposo y tener un mejor lijado o abrasión de las semillas.

Gráfica 2. Diferencias en los porcentajes de germinación de tuna roja



A los 14 días el tratamiento 3 (nejayote 100%) registró un 6.25% de germinación igual que el control (TC), pero al para el tiempo el tratamiento con nejayote mostró un incremento importante de hasta el 25% en los periodos registrados. Los códigos T2 a T5 corresponden al número de tratamientos.

Transcurridos catorce días se obtuvieron los primeros resultados, se registró un 6.25% de germinación en todos los tratamientos a excepción del T5 (agua+HCl); a los 35 días se observó un cambio significativo debido a que el T2 tuvo un 31.25% de semillas germinadas; el T5 tenía un 43.75% y los tratamientos problema se mantuvieron en un 25%; al día 56 el T2 mostró una disminución a causa de la muerte de algunas plántulas, la germinación aumentó en el T5 así como en los tratamientos problemas

teniendo un 18.75% en el T3 y un 37.5% en el T4, al día 77 cuando se realizó la última observación el T2 presentó solamente un 25 % de germinación, el tratamiento control mostró un 12.5% con el menor número de plántulas germinadas en todo el proceso experimental; el T3 (nejayote 100%) disminuyó de 25% a 18.75% por lo que no hubo tanta efectividad; la comparación importante es entre el T5 y el T4 (nejayote 50%) las semillas de los dos tratamientos fueron tratadas durante 24 horas, finalmente con T5 se obtuvieron el 43.75% de semillas germinadas, en cambio, el T4 superó esta cantidad con un 50% de germinación.

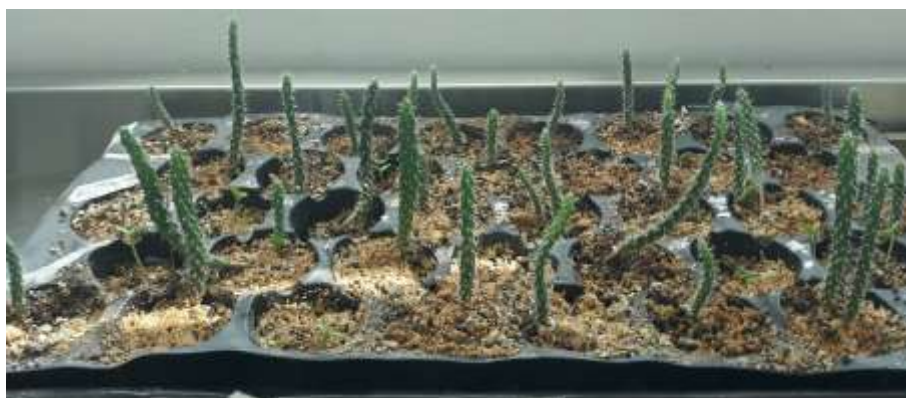


Figura 15. *Desarrollo de las plántulas de tuna roja de las semillas pretratadas el 31 de agosto del 2022.*

Si comparamos los resultados de germinación entre la tuna verde y roja, podemos apreciar (tabla 9,10) que en la tuna roja los tiempos de germinación se acortan de manera natural, tratamiento control, la roja germinó a los 14 días posteriores a los tratamientos y siembra; la tuna verde germinó a los 31 días, sin embargo, al paso de los días las semillas tratadas alcanzaron mejor tasa de germinación.

Tabla 9. Comparativa del tiempo en días de germinación entre los dos tipos de tuna.

| Número asignado | Tipo de tratamiento | Tuna verde | Tuna roja |
|-----------------|-------------------------------|------------|-----------|
| 2 | H ₂ O ₂ | 31 | 27 |
| 3 | nejayote 100% | 44 | 14 |
| 4 | nejayote 50% | 44 | 14 |
| 5 | HCl | 35 | 27 |
| C | Control | 35 | 27 |

También se detectaron diferencias en los porcentajes germinativos, puesto que el tratamiento control fue el que no mostró un porcentaje significativo de germinación. Es así como los resultados fueron positivos; recapitulando, el menor tratamiento (s) fue el de la tuna roja, ahora bien, el porcentaje de germinación se vio favorecido con el remojo del desecho diluido, además de la aplicación de la escarificación con lija en la variedad de tuna roja, por lo tanto, es recomendable para la propagación mediante semillas. Por otro lado, con las plantas germinadas se midieron algunos de sus parámetros de desarrollo que refleja su crecimiento vegetal, como se presenta en los siguientes resultados.

8.3.1. Análisis ANOVA y Tukey, primera variable

Se compararon las mediciones de las dos variedades en tres puntos importantes del experimento, los resultados se analizaron con un nivel de significancia de 0.05, los resultados del % de germinación como la primera variable (ver anexo 1).

Tabla 10. Comparativa de los porcentajes máximos de germinación entre los dos tipos de tuna.

| Número de tratamiento | Tipo de Tratamiento | Tuna verde | Roja |
|-----------------------|-------------------------------|------------|-------|
| 2 | H ₂ O ₂ | 6.66 | 25 |
| 3 | nejayote 100% | 8.33 | 18.75 |
| 4 | nejayote 50% | 6.66 | 50 |
| 5 | HCl | 8.33 | 43.75 |
| C | Control | 12.5 | 12.5 |

8.4. Registros del desarrollo vegetal

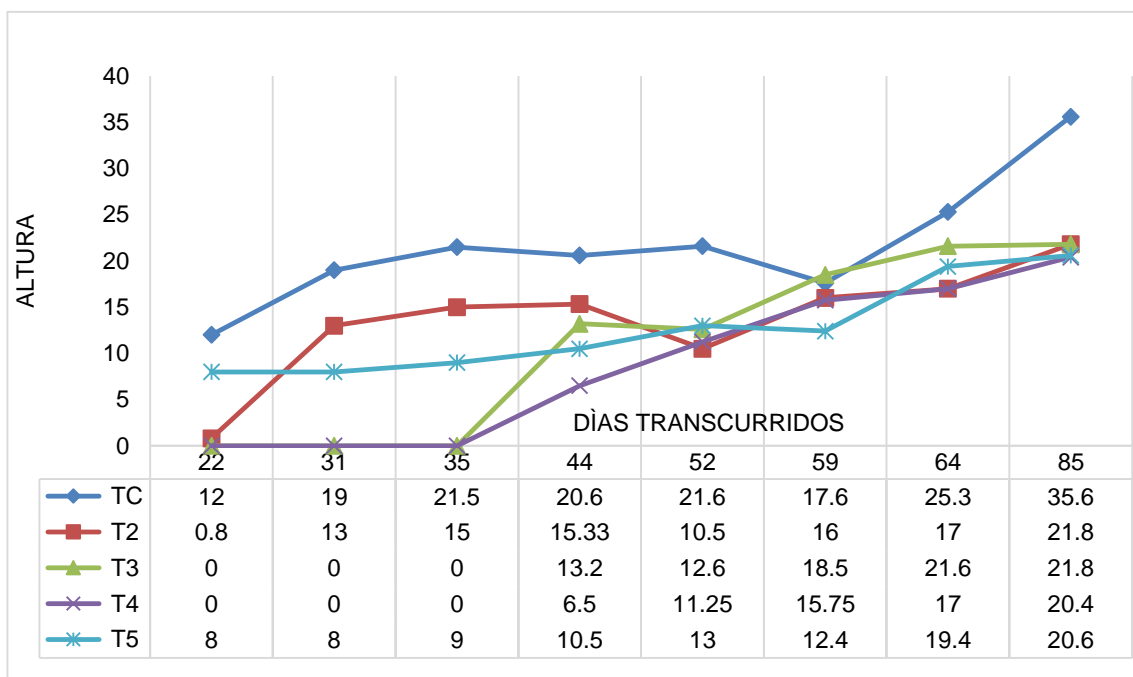
El crecimiento de las plántulas fue diferente entre los tratamientos. Las partes en las que se observaron las diferencias fueron la raíz (longitud) y el hipocótilo (altura), debido a esas diferencias, el tamaño general de las plántulas también fue diferente entre los tratamientos.



Figura 16. Medición de las dimensiones de las plántulas con ayuda de un vernier.

El crecimiento aéreo se midió con ayuda de un vernier seccionando un segmento del tallo, se registró la variación de su longitud y se graficó el valor con respecto al tiempo.

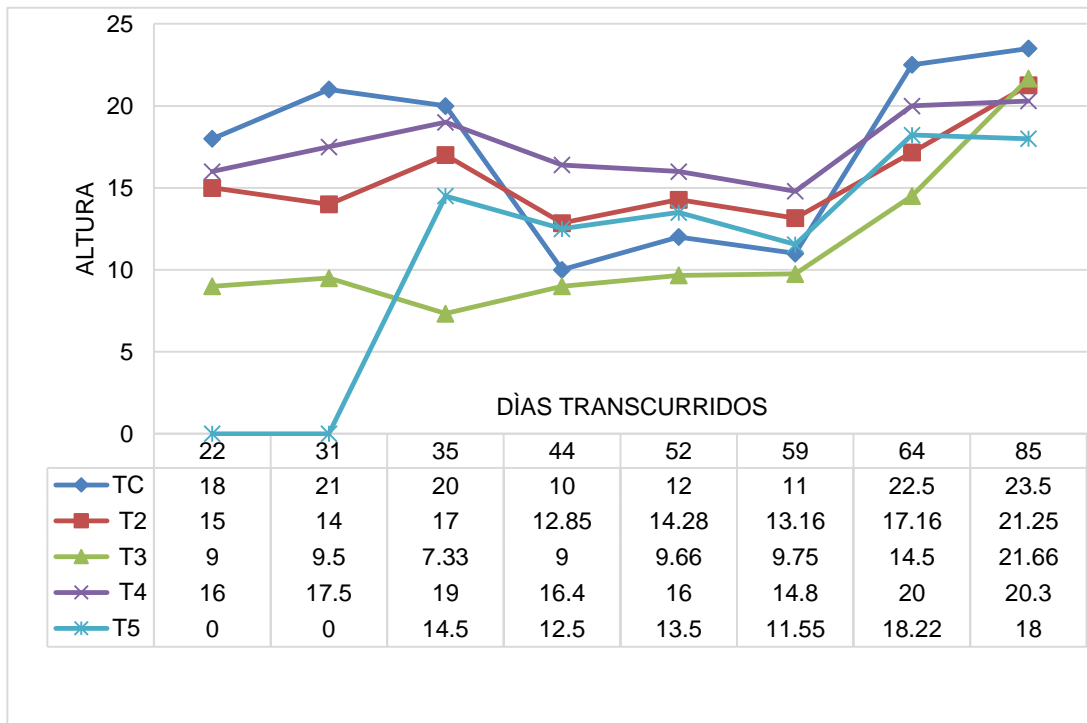
Gráfica 3. Comparación de alturas entre los tratamientos de tuna verde



Se observa que el tratamiento control (TC) tuvo un incremento entre 64 y 85 días. Siendo las plantas con mayor desarrollo por encima de los diferentes tratamientos.

Los resultados del crecimiento de las plántulas de tuna verde (gráfica 3) indicaron que el remojo por 24 horas con ácido clorhídrico diluido (T5) pudo haber dañado parcialmente a los embriones y provocado disminución del crecimiento. Así también en el caso del T4 la exposición al nejayote en menor concentración (50%) pudo no haber sido suficiente para el pronto rompimiento de la testa. El crecimiento menor de las plántulas también pudo ser aparente debido a que en ambos tratamientos las emergencias inicial y total presentaron varios días de retardo respecto al testigo (TC), el cual se observó que tuvo una gran diferencia en comparación a los demás tratamientos.

Gráfica 4. Diferencia de alturas entre los tratamientos de tuna roja



Algunos resultados se asemejan a los de la tuna verde, se podría afirmar que ocurrió el mismo problema en el T5, ya que hubo una disminución de altura por el probable daño de los embriones y en el T4 no fue suficiente la concentración de efluente para un buen crecimiento; sin embargo, los demás tratamientos, TC, T2 y T3 tuvieron números similares. Es cierto que el TC mostró mayor altura, sin embargo, el número de plántulas fue menor (gráfica 4) por lo que no garantiza ser el mejor pretratamiento para las semillas de testa dura, como lo son las de tuna.

8.5. Medición de crecimiento de las raíces

Se dio el seguimiento el crecimiento de la raíz solo a la tuna roja porque presentaron una mayor diferencia en crecimiento. La raíz primaria fue medida para obtener los promedios de altura.

Tabla 11. *Comparativa del crecimiento de las raíces*

| Número de tratamiento | Tipo de Tratamiento | Promedio |
|-----------------------|-------------------------------|----------|
| 2 | H ₂ O ₂ | 9.76 |
| 3 | nejayote 100% | 6.13 |
| 4 | nejayote 50% | 8.4 |
| 5 | HCl | 2.43 |
| | TC | 5.63 |

Se comparó el tratamiento control con los tratamientos problema y se observó que el promedio del tratamiento tres respecto al tratamiento control fue mayor, además de que, con las mediciones de la raíz, se registraron valores más altos.

8.5.1. Análisis ANOVA y Tukey, segunda variable

La segunda variable fisiológica de las plantas fue el crecimiento aéreo o la llamada altura de las plántulas; de la misma manera que para el desarrollo de las raíces, se compararon tres puntos iniciando con los registros del día 44; los resultados se presentan en el anexo 1.



Figura 17. Comparación de raíces entre TC y T3, se observa el desarrollo radicular de ambos tratamientos, así como la altura aproximada de acuerdo a la escala.



Figura 18. Diferencias entre tratamiento control contra el cuarto tratamiento.

El cuarto tratamiento arrojó los mejores resultados en cuanto a tratamientos problema, por lo que en este rubro se considera como una buena opción para el enraizamiento en el suelo.

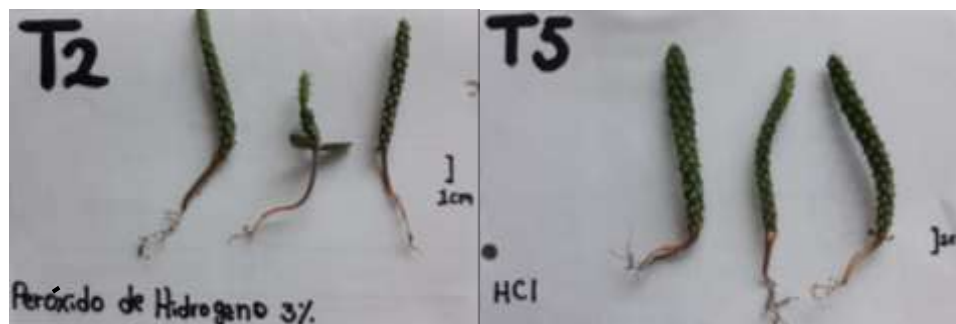


Figura 19. Tratamiento 2 y tratamiento 5 donde se muestra la longitud de las raíces.

Para valorar si las respuestas en la germinación y en el crecimiento vegetal están influenciadas por la población microbiana nativa del nejayote, se procedió a la propagación y aislamiento de los microorganismos alcalófilos.

8.6. Aislamiento de microorganismos alcalófilos del nejayote.

Se realizó la propagación de los microorganismos, gracias al reposo del desecho durante 60 días a temperatura ambiente, una vez que se observó crecimiento, se sembró por medio de extensión en placa en tres medios; trabajó con medio PDA pH 3.5, agar para métodos estándar y PDA pH 5.6, estas placas fueron incubadas a 37°C por cinco días para que se diera el crecimiento, posteriormente se preservaron a 4°C en el cuarto frío, en el transcurso del experimento se trabajaron con tres muestras diferenciadas por su estado sólido, líquido y la combinación de los anteriores.

El nejayote fue colocado en frascos a temperatura ambiente para la propagación de microorganismos (figura 20), se trabajó con la parte líquida y sólida en frascos distintos, transcurridos los sesenta días se apreció en desarrollo microbiano.



Figura 20. *Desarrollo microbiano en el sustrato líquido, sobre nejayote incubado a temperatura ambiente durante dos meses.*

Una vez que hubo crecimiento notable, se procedió a hacer la combinación del nejayote en estado sólido y líquido para posteriormente hacer la siembra por extensión en placa en donde después de diez días se presentó el desarrollo que se muestra en la figura 21, donde se observan colonias de bacterias y crecimiento de hongos en los tres medios de prueba, luego estas placas fueron incubadas en el cuarto frío para su conservación a 4°C y futuro uso.



Figura 21. *Desarrollo de hongos y bacterias en los diferentes medios para su posterior inoculación en medio líquido.*

Con el desarrollo microbiano en los medios sólidos, al azar fueron seleccionadas algunas colonias para su propagación en medios líquidos, el desarrollo fue empleado para empacar las células y proceder con la extracción de ADN genómico (gADN).

8.7. Extracción gDNA.

Se realizó la extracción del gDNA para lo cual se empleó el traspase de placa a medios líquidos, por lo que el medio PDA se sustituyó por papa dextrosa en líquido y a su vez el agar para métodos estándar se cambió por medio LB; por lo tanto, se realizó una siembra en tres tubos que se incubaron a 28°C y se mantuvieron en agitación durante 20 horas. Una vez listos los reactivos se procedió a comenzar el proceso siguiendo las indicaciones que se mencionan en la sección (7.4.4) tres muestras fueron procesadas.



Figura 22. *Parte final del proceso de extracción de gDNA.* Se puede observar el fondo del tubo en donde se encuentra la pastilla resultante del proceso después de la centrifugación, en donde se tiene el material genético deseado.

Como se marca en el protocolo de extracción, la pastilla seca y libre de sales fue resuspendida en grado biología molecular para su presentación a 20°C bajo cero y/o su análisis molecular mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (figura 23) con un control de tiempo y corriente eléctrica aplicada con una fuente de poder marca Thermo Scientific.



Figura 23. *Corrimiento del material genético suspendido en buffer de carga con dos colorantes para el control de los frentes base.*

Transcurridos ciclos de veinte minutos la electroforesis se detenía para proceder a la tinción con bromuro de etidio y lavados con buffer de corrimiento; el principio de los ciclos de tinción-lavado-corrimento- lavado, fue para mejorar la calidad de la imagen y facilitar su análisis.

Transcurrido el tiempo de noventa minutos, el gel se expuso a rayos ultravioleta y con ayuda del fotodocumentador Thermo Scientific se pudo obtener la imagen que se presenta en la figura 24, es aquí donde se observó la calidad del material genético.

1 2 3



Figura 24. Muestras el producto de la electroforesis sometida a voltaje constante en gel de agarosa al 0.8%. En cada carril se cargaron dos microlitros de gADN, en el primer carril de izquierda a derecha se encuentra la muestra número uno (PDL pH5.6), en el segundo la muestra número dos (PDL pH3.5) y en el tercer carril la muestra número tres (LB).

Claramente, se aprecia el éxito del protocolo y principalmente la calidad y concentración del material genético. Podemos observar que a pesar de los lavados durante la extracción, se mantiene una alta concentración de RNA total; se trató para bajar su concentración y evitar interferencias en las reacciones posteriores mediante una reacción de digestión con RNasa.

8.8. Reacción de degradación de RNA contaminante del gDNA

Empleando la enzima RNasa A, los gADNs (figura 24) se preparó una mezcla de reacción, como se describe en el apartado (7.4.7) de la metodología, las mezclas fueron incubadas a 37°C durante dos horas para verificar posteriormente mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a lapsos de 15 minutos de corrimiento 70 V. La secuencia de las muestras analizadas, incluyendo un control, fue la que se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. *Secuencia del gel de electroforesis al 0.8% de la reacción de degradación de RNA contaminante*

| N° de pozo | volumen (μ L) empleado del gDNA | Muestra de gDNA |
|------------|--------------------------------------|-----------------|
| 1(C) | 3 | PDL pH 6.5 |
| 2 | 5 | PDL pH 5.6 |
| 3 | 5 | PDL pH 3.5 |
| 4 | 5 | LB |

La integridad y calidad del material genético tratado se presenta en la figura 25. Se puede apreciar que después de dos horas de reacción degradadora, en las cuatro muestras, incluyendo el plásmido control (carril 1), aún se visualiza niveles variables de RNA contaminante. Debido a lo anterior, el volumen restante de cada una de las cuatro reacciones se incubó a la temperatura mencionada por el resto de la noche.

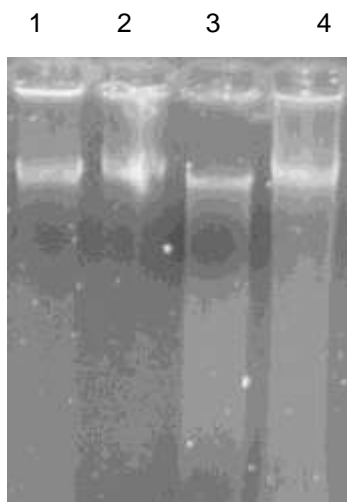


Figura 25. *Muestras del gADN tratadas con RNasa A y producto de su electroforesis a voltaje constante en gel de agarosa al 0.8% . En cada carril se cargaron dos microlitos de gADN. El orden de las muestras se presenta en la tabla 12*

De esta manera fue posible lograr la eliminación total del RNA, que en algún momento pudiera ser un factor limitante para ejecutar de manera exitosa las reacciones posteriores. También se logró preservar un gDNA de buena concentración y con suficiente volumen para el desarrollo final del trabajo experimental, es decir, las reacciones de digestiones mixtas, purificación y clonación final.

8.9. Reacciones mixtas de digestión del gADN

Las muestras de gDNA pretratado con la RNasa A, fueron sometidas a una reacción de digestión mixta empleando las endonucleasas *Eco RI*, *Eco RV* y *XhoI* (tabla 7), siguiendo las indicaciones y concentraciones recomendadas, e incubando las reacciones a 37°C durante quince horas, los productos fueron analizados y visualizados mediante electroforesis y radiación ultravioleta complementando su fotodocumentación(figura 26).

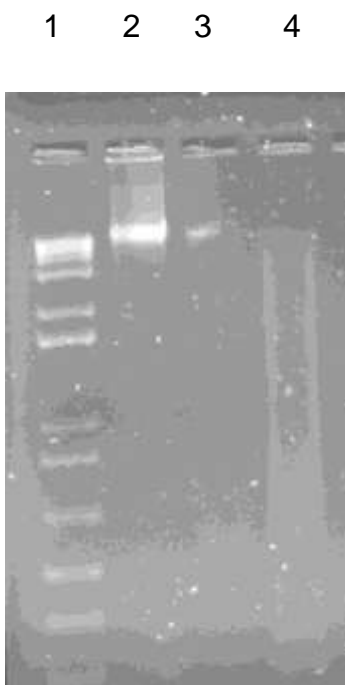


Figura 26. *Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de reacción mixta. 2 µL de marcado de peso 1Kb Plus (1), 2 µL de gDNA pH 5.6 (2), 5 µL de digestión del tubo pH 3.5 (3), 5 µL de digestión del tubo LB (4).*

Como se aprecia en los carriles 3 y 4 de la figura anterior, muestran un patrón diferente respecto a la muestra de gADN no tratado, carril dos; por otro lado, las dos muestras seleccionadas, muestran un patrón de corrimiento tipo barrido, típico y exitoso para

este tipo de reacciones mixtas, es decir, las condiciones y concentraciones de los agentes aplicados fueron los necesarios para que los gDNA fueran fragmentados en tamaños múltiples que posteriormente, y parte final del trabajo, serían clonados y transformados en células competentes para su conservación o secuenciación. Es decir, la construcción de la minibiblioteca genómica.

8.10. Clonación y transformación de células competentes

De cada una de las muestras seleccionadas, se realizó la ligación en el vector “p- Drive Cloning Vector” empleando dos microlitros de las reacciones mixtas de digestión, 5 microlitros del buffer de ligación 2X, 0.5 microlitros de T4 DNA ligasa y agua grado biología molecular para un volumen final de 10 microlitros; las reacciones fueron incubadas 30 minutos a 16°C. Transcurrido el tiempo 5 microlitros de la reacción almacenados a 20°C bajo cero y el volumen restante fue empleado para la transformación de células competentes *E. Coli DH5[∞]* por choque térmico, para ello la reacción de digestión se adicionó a las células, después 30 minutos a 4°C se aplicó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto treinta segundos, se incubó 5 minutos a 4°C para la adición de medio LB libre de antimicrobianos, se incubó a 37°C durante 1 hora y las células fueron inoculadas en placas de medio LB con antimicrobianos de selección para inducir su crecimiento a 37°C durante 10 horas.

De esta manera se logró el crecimiento de colonias aisladas (figura 27) que teóricamente tienen algún fragmento de gADN corto integrado a su genoma.



Figura 27. Placas mostrando el desarrollo de células candidatas positivas seleccionadas en los medios LB y PDA con antimicrobianos. Se muestra del lado derecho la placa con medio LB, a la izquierda se encuentra la placa con medio PDA acidificado.

Esta es una minibiblioteca de gDNA que deberá ser analizada y/o sembrada en placa para su escrutinio y selección de las clonas candidatas que deberán ser confirmadas mediante digestión y PCR con oligos universales SP6 y T7. En esta minibiblioteca se espera identificar genes o sus fragmentos responsables de una diversidad de procesos celulares o metabólicos que influyen en la inhibición de patógenos vegetales, específicamente del maíz, microorganismos extremófilos de tolerancia a esas condiciones particulares, como lo es el pH básico, microorganismos estimulantes del crecimiento celular, por mencionar. Estas suposiciones deberán de ser probadas mediante la secuenciación de clonas candidatas.

En otras palabras, en este trabajo se logró la construcción de la biblioteca genómica, quedando como una nueva oportunidad para su análisis bioinformático y su aplicación con el uso de genes específicos que resulten de interés y en beneficio del agricultor.

Conclusiones

9. Conclusiones

La germinación que se obtuvo en tuna verde no fue la más deseada, por lo que la prueba con tetrazolio parece la más adecuada para conocer la viabilidad y el vigor de los embriones de *Opuntia* para mejora de la germinación y futura siembra. La sugerencia es el cambiar las condiciones de los tratamientos, la concentración del efluente, así como los tiempos de reposo y tener un mejor lijado o abrasión de las semillas.

Al comparar los resultados de germinación entre la tuna verde y roja, se concluye que en la tuna roja los tiempos de germinación se acortaron de manera natural, se detectaron diferencias en los porcentajes germinativos, puesto que el tratamiento control fue el que no mostró un porcentaje significativo de germinación. Es así como los resultados fueron positivos; recapitulando, el menor tratamiento (s) fue el de la tuna roja, ahora bien, el porcentaje de germinación se vio favorecido con el remojo del desecho diluido, además de la aplicación de la escarificación con lija en la variedad de tuna roja, por lo tanto, es recomendable para la propagación mediante semillas.

El crecimiento de las plántulas en las dos variedades se vio afectado, ya que hubo una disminución de altura por el probable daño de los embriones y la concentración de efluente para un buen crecimiento.

En cuestión a enraizamiento, el cuarto tratamiento arrojó los mejores resultados en cuanto a tratamientos problema, por lo que en este rubro se considera como una buena opción para el enraizamiento en el suelo.

Se generó una mini biblioteca de gDNA que deberá ser analizada y/o resembrada en placa para su escrutinio y selección de las clonas candidatas que deberán ser confirmadas mediante digestión y PCR con oligos universales SP6 y T7.

10. Perspectivas

1. Aplicar el crecimiento microbiano total en el tratamiento de semillas y como agente de riego en las plántulas.
2. Monitorear las respuestas fisiológicas y metabólicas básicas de los tratamientos *in vivo*.
3. Realizar PCR colony y seleccionar algunas clonas candidatas para su secuenciación.
4. Realizar un análisis bioinformático para la construcción de una filogenia e identificar grupos de microorganismos de las muestras analizadas.
5. Con el análisis anterior, buscar una aplicación, agrícola, industrial, alimentaria, ambiental, específica para el o los microorganismos identificados.

Anexos

Anexo 1. Explicación de análisis ANOVA y Tukey

Hipótesis nula: el promedio de % germinación en los dos grupos es igual, con 95% de confiabilidad.

Hipótesis alterna: en al menos un grupo el promedio de % germinación es distinto, con 95% de confiabilidad.

Se compararon las mediciones de las dos variedades en tres puntos importantes del experimento, los resultados se analizaron con un nivel de significancia de 0.05, los resultados del % de germinación como la primera variable.

Tabla 13. *Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos al día 44 de los registros de germinación*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 30.82 | 6.164 | 14.45223 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 162.5 | 32.5 | 125 |

En esta tabla podemos ver que la variedad tuna roja (columna 2) obtuvo el puntaje promedio más alto del 32.5 en el experimento al día 44, también tuvo 125 en varianza, valor más alto en el porcentaje de germinación.

Tabla 14. *Tabla Anova al día 44 de los registros de germinación*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 1733.96224 | 1 | 1733.96224 | 24.87 | 0.001 | 5.317655072 |
| Dentro de los grupos | 557.80892 | 8 | 69.726115 | | | |
| Total | 2291.77116 | 9 | | | | |

- Segundo punto (día 59 verde, día 51 roja)

Tabla 15. *Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 50-60 de los registros de germinación*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 39.14 | 7.828 | 6.82112 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 175 | 35 | 207.03125 |

Nuevamente a los días 50-60 la tuna roja obtuvo el promedio y la variación más alta en porcentaje de germinación. Con el análisis estadístico se generan los siguientes datos.

Tabla 16. *Tabla Anova a los días 50-60 de los registros de germinación*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 1845.79396 | 1 | 1845.79396 | 17.262 | 0.003 | 5.317655072 |
| Dentro de los grupos | 855.40948 | 8 | 106.926185 | | | |
| Total | 2701.20344 | 9 | | | | |

La información estadística nos ayuda a determinar que se acepta la hipótesis alterna, entre los días 50-60 hubo diferencia significativa en las medias de las dos variedades.

Al realizar una comparación en un tercer punto de las mediciones, al día 64 y 77 verde y roja respectivamente, se obtienen los datos que a continuación se muestran:

- Tercer punto (día 64 verde, día 77 roja)

Tabla 17. *Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 60-70 de los registros de germinación*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 42.48 | 8.496 | 5.70723 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 150 | 30 | 261.71875 |

En la última medición del experimento el resultado promedio y varianza de la tuna roja permaneció en primer lugar.

Tabla 18. *Tabla Anova a los días 60-70 de los registros de germinación*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 1156.05504 | 1 | 1156.05504 | 8.65 | 0.019 | 5.317655072 |
| Dentro de los grupos | 1069.70392 | 8 | 133.71299 | | | |
| Total | 2225.75896 | 9 | | | | |

Se rechaza la hipótesis nula al ser menor el valor de p, por lo que en al menos un grupo el promedio de porcentaje de germinación es distinto, con un 95% de confiabilidad.

Altura de las plántulas

Hipótesis nula: el promedio de altura en los dos grupos es igual, con 95% de confiabilidad.

Hipótesis alterna: en al menos un grupo el promedio de altura es distinto, con 95% de confiabilidad.

La segunda variable fisiológica de las plantas fue el crecimiento aéreo o la llamada altura de las plántulas; de la misma manera que para el desarrollo de las raíces, se compararon tres puntos iniciando con los registros del día 44; los resultados se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 19. *Análisis Anova y prueba Tukey entre los diferentes tratamientos a los días 44 de los registros de altura*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 66.13 | 13.226 | 27.86838 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 60.75 | 12.15 | 8.305 |

La variedad tuna verde (columna 1) obtuvo el puntaje promedio más alto, 12.23, del experimento al día 44 del desarrollo vegetal de igual manera la variación más alta en las alturas registradas con un valor de 27.86.

Tabla 20. *Tabla Anova a los 44 días de los registros de altura*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 2.89444 | 1 | 2.89444 | 0.160 | 0.700 | 5.317655072 |
| Dentro de los grupos | 144.69352 | 8 | 18.08669 | | | |
| Total | 147.58796 | 9 | | | | |

Dado que el valor p fue mayor que $\alpha = 0.05$, se acepta la hipótesis nula del ANOVA y se concluye que se tiene evidencia para decir que las medias de los grupos fueron iguales al día 44 de medición.

- Segundo punto (día 59)

Tabla 21. *Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey para comparar el crecimiento aéreo a los 59 días del monitoreo vegetal*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 80.25 | 16.05 | 5.455 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 60.26 | 12.052 | 3.85927 |

El promedio de la tuna roja fue el mayor; sin embargo la varianza más alta fue la de la variedad de tuna verde.

Tabla 22. *Tabla Anova a los 59 días de los registros de altura*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 39.96001 | 1 | 39.96001 | 8.580 | 0.019 | 5.317655072 |
| Dentro de los grupos | 37.25708 | 8 | 4.657135 | | | |
| Total | 77.21709 | 9 | | | | |

Se rechazó la hipótesis nula al ser menor el valor de p, por lo que en al menos un grupo, el promedio de alturas es distinto, con 95% de confiabilidad.

- Tercer punto (día 85)

Tabla 23. *Análisis estadístico mediante ANOVA y prueba Tukey para comparar el crecimiento aéreo a los 85 días del monitoreo vegetal*

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Columna 1, Tuna verde | 5 | 120.2 | 24.04 | 42.188 |
| Columna 2, Tuna roja | 5 | 104.71 | 20.942 | 4.05532 |

Tabla 24. *Tabla Anova a los 85 días de los registros de altura*

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 23.99401 | 1 | 23.99401 | 1.038 | 0.338 | 5.317655 |
| Dentro de los grupos | 184.9732 | 8 | 23.12166 | | | |
| Total | 208.96729 | 9 | | | | |

El factor p resulto ser mayor que el nivel de significancia, por lo que promedio de altura en los dos grupos es igual, con 95% de confiabilidad.

Con el análisis estadístico anterior al comparar tres puntos del desarrollo de las tunas, nos permite decir que el mejor desarrollo en altura fue para la tuna roja.

Anexo 2. Determinación de la dureza del grano a través del índice de flotación en solución de azúcar comercial

Bennet (1950) define a la dureza del grano de maíz como la fuerza necesaria para romperlo para medir esta característica, se pueden emplear métodos directos en los que se mide esta fuerza en cada grano mediante el uso de texturómetros tales como el Instron (Texturometro de Harry Mazal) o el analizador de textura TA-X T2i (Stable Microsystems, UK). Además de que estos dos equipos son costosos, las diferencias que se observan entre un grano y otro son elevadas (C.V.=37%), lo que obliga a medir un número grande de granos, tarea que es muy laboriosa y tardada. Existen métodos indirectos para determinar la dureza del grano que se basan en medir alguna característica del grano asociada con su dureza. Tal es el caso del Índice de Flotación (IF), que es una medida relativa de la densidad del grano.

Una solución de azúcar con la misma densidad que la solución de nitrato de sodio al 41% brinda resultados similares al método oficial. Es decir, el número de granos flotantes en la disolución (mayor dureza da un menor índice de flotación). Esta metodología permite determinar la dureza de todo tipo de granos de maíz, permitiendo su clasificación en granos suaves, intermedios, duros y muy duros, asignando un tiempo de cocción durante los procesos de nixtamalización en función de dicha dureza.

Anexo 3. Procedimiento de preparación de la disolución de azúcar al 67%

- 1) Agregar 1L de agua purificada en una botella vacía de 1.5L, marcar con una línea el volumen ocupado y retirar el agua.
- 2) Pesar 670g de azúcar refinada y depositarla en la botella previamente marcada.
- 3) En la botella con azúcar adicionar agua purificada hasta la marca realizada, cerrarla y agitar hasta disolver el azúcar. El volumen de líquido disminuirá debido a la incorporación del azúcar, por lo que será necesario agregar otra vez agua hasta la marca y agitar nuevamente para homogeneizar la disolución. Una vez disuelta el azúcar, el volumen total de la disolución será 1L.
- 4) Seleccionar 100 granos sanos de cada muestra y registrar su peso (PCG).
- 5) Adicionar 500mL de la disolución de azúcar en un vaso de precipitado de 1L.
- 6) Verter los 100 granos en la disolución y agitar 3 veces a la derecha y 3 veces a la izquierda con ayuda de un agitador de vidrio o cuchara.
- 7) Dejar reposar por 1 minuto para que los granos floten o se vayan al fondo.
- 8) Retirar los granos flotantes con ayuda de una cuchara, depositarlos en un colador y cuantificarlos.
- 9) Determinar la dureza del grano.

Anexo 4. Elaboración de PDA(Agar Papa Dextrosa) y medio líquido PDL (Líquida Papa Dextrosa).

Propósito de uso

Uso en laboratorio

Es un medio de propósito general para levaduras y mohos que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos.

Principios de procedimiento

Está compuesto por infusión de papa deshidratada y Dextrosa que fomentan el crecimiento exuberante de los hongos. Muchos procedimientos estándares usan una cantidad específica de ácido tartárico estéril(10%) para reducir el pH de este medio a 3.5 ± 0.1 , y así inhibir el crecimiento bacteriano.

Presentación

1. Medio solidificado PDA

En esta formulación contiene agar adicionado como agente solidificante, posterior a su preparación es vertido en placas Petri o en tubos de ensayo o tubos eppendorf, de acuerdo a su requerimiento.

2. Medio líquido PDL

En esta formulación NO contiene agar, se preserva de manera líquida que posterior a su preparación es vertido en tubos de ensayo o tubos eppendorf, de acuerdo a su requerimiento.

Fórmula para la elaboración de un litro

Infusión de papa(potato infusion) a partir de 200g.....4 g*

Dextrosa(Dextrose).....20g

Agar.....15g

4.0 g de extracto de papa es equivalente a 200g de infusión de papas

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C

Referencias

- Agua.org.* (19 de Febrero de 2018). Obtenido de <https://agua.org.mx/actualidad/aguas-residuales-contaminacion-en-mexico/>
- Arámbula Villa Gerónimo, B. Á. (junio de 2001). Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000200011
- Argun, M. Ş. (2017). Treatment and alternative usage possibilities of a special wastewater: Nejayote. *Food Process Engineering*. doi:10.1111/jfpe.12609
- Canul, J. S. (29 de abril de 2016). OBTENCIÓN DE METANO A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES DE MAÍZ(NEJAYOTE) MEDIANTE DOS REACTORES EN SERIE .
- Carrasco, J., Ortiz, P. M., S, C. S., & F, J. F. (s.f.). *Biblioteca Digital INIA*. Obtenido de Biblioteca Digital INIA: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42415.pdf>
- CIBIOGEM. (s.f.). CONACYT. Recuperado el 03 de diciembre de 2022, de <https://conacyt.mx/cibiogem/maiz>

CONABIO. (2020). *Maíces*. Obtenido de Biodiversidad mexicana:
<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices>

Díaz Montes, E. C. (29 de Marzo de 2016). *revistas.chapingo.mx*.
doi:<http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2016.03.002>

DOF - *Diario Oficial de la Federación*. (07 de Julio de 2020). Obtenido de
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5596232&fecha=07/07/2020#gsc.tab=0

Francisco Manuel Blanco, F. d. (1880-1883).

Frías, J. C. (2012). *Propagación y técnicas de cultivo del Maíz en grano (Zea mays)*.
Obtenido de vinculando.org:
<https://vinculando.org/mercado/agroindustria/propagacion-y-tecnicas-de-cultivo-del-maiz-en-grano-zea-mays.html>

Jorge Carrasco F, e. c. (s.f.). *biblioteca.inia.cl*. Obtenido de biblioteca.inia.cl:
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42415.pdf?sequence=14&isAllowed=y>

McCormick. (18 de Mayo de 2020). Obtenido de <https://www.mccormick.it/mx/todos-los-datos-actualizados-sobre-la-produccion-de-maiz-en-el-mundo/>

Moreno, Y. S., & Gricelda Vázquez. (Diciembre de 2006). METODOLOGIAS DE ANÁLISIS DE LA CALIDAD NIXTAMALERA-TORTILLA EN MAÍZ. (No.23). Inifap.

Narváez, Y. D. (20 de junio de 2016). *Monografias.com*. Obtenido de Monografias.com: <https://www.monografias.com/docs110/analisis-calidad-semillas-opuntia-ficus-indica-l-mill-chumbera-tuna-o-nopal/analisis-calidad-semillas-opuntia-ficus-indica-l-mill-chumbera-tuna-o-nopal2>

Palacios Rojas, N. (2018). (CIMMYT, Ed.)

Pérez, N. C. (Enero de 2012). POTENCIAL DEL CONCENTRADO DE NEJAYOTE PRE-TRATADO COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL. Hermosillo, Sonora.

Ramayo, R. (s.f.).

Ramírez Jiménez, A. K. (25 de julio de 2020). Emerging techniques assisting nixtamalization products and by-products processing: an overview *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-2. doi://doi.org/10.1080/10408398.2020.1798352

Rojas, P. (2018). *repository.cimmyt.org*. Recuperado el 2023, de <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/19667/59829.pdf>

Roque Maciel, L. A.-V.-E.-L.-C.-C. (2016). *redalyc.org*. (Agrociencia, Ed.) Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/302/30247467006.pdf>

Serrano Rivero, Y., Hernández García, A., & Fando Calzada, R. (mayo-agosto de 2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(2).

Tapia-Tussell, R. L.-R.-F.-S.-B. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular biotechnology*, 33, 67-70.

unam.mx. (14 de Febrero de 2013). Obtenido de http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=25

Varela, A. S., & Arana, V. (Marzo de 2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos.

Vázquez, M. E. (01 de febrero de 2016). IMBIBICIÓN, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLAS DE CUATRO ESPECIES DE *Opuntia* CON GRADO DISTINTO DE DOMESTICACIÓN. *Agrociencia*, 51(1), 27-42. Obtenido de scielo.org.

Viveros, H. V. (agosto de 2015). Análisis de semilla, tratamientos pregerminativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y su crecimiento inicial. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(30).